

EGY NEM KONVENCIONÁLIS MIOZIN KÖNNYŰ LÁNC VIZSGÁLATA

Doktori (Ph.D.) értekezés

Hódi Zsuzsa

Eötvös Loránd Tudományegyetem Biológia Doktori Iskola

Doktori Iskola vezetője: Dr. Erdei Anna

Szerkezeti Biokémia Doktori Program

Programvezető: Dr. Gráf László



Témavezető: Dr. Nyitray László

Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar Biológiai Intézet

Biokémiai Tanszék

Budapest, 2012

Tartalomjegyzék

1.	Rövidítések jegyzéke	4
2.	Összefoglalás	5
3.	Summary	6
4.	Irodalmi összefoglaló	7
4.1.	DLC	7
4.2.	Miozin-5a	14
5.	Célkitűzések	17
6.	Anyagok és módszerek	18
6.1.	A DNS konstrukciók elkészítése	18
6.2.	A fehérjék elkészítése	20
6.3.	GST-„pull-down” assay	21
6.4.	Gélszűrés	22
6.5.	Cirkuláris dikroizmus spektroszkópia (CD)	22
6.6.	Limitált proteolízis	24
6.7.	Transzfekció és kolokalizáció	25
6.8.	NMR spektroszkópia	25
6.9.	Molekuláris dokkolás	25
6.10.	Izotermális titrációs kalorimetria (ITC)	26
6.11.	Natív PAGE	27
6.12.	Szerkezet predikció	27
6.13.	Analitikai ultracentrifuga	28
6.14.	Kináz aktivitás mérése	28
6.15.	Élesztő-két-hibrid rendszer és kék-fehér szelekció	28
7.	Eredmények	30
7.1.	A DLC és a miozin-5a kölcsönhatása	30
7.1.1.	A DLC2 pontos kötőhelyének meghatározása a miozin-5a-n	30
7.1.2.	A „B” alternatív exon szerepe a DLC2 kötődésében	32
7.1.3.	A miozin kötőfelszínének meghatározása a DLC-n	35
7.1.4.	A DLC kötődésének hatása a miozin-5a szerkezetére, avagy a kötődés kiváltotta szerkezetváltozás	39
7.1.5.	A miozin-5a DLC-kötő régiójának szerkezeti jellemzése	44
7.1.6.	A DLC – miozin-5a komplex sztöchiometriája és a kötés erőssége	47

7.2.	Egyéb DLC kötőpartnerek	52
7.3.	Pak1 kináz általi foszforiláció hatása a DLC-re.....	53
7.3.1.	A DLC (Ser88) foszforilációja	53
7.3.2.	A Pak1 kináz DLC kötőhelyének azonosítása.....	53
7.3.3.	A DLC Pak1 általi foszforilációja	55
7.3.4.	A Ser88 foszforiláció hatása a DLC-re.....	56
7.3.5.	A foszforilált DLC miozin-5a kötése	60
8.	Megbeszélés és további célkitűzések.....	62
8.1.	A miozin-5a rúd pontosított szerkezete	62
8.2.	Egyéb DLC kötőpartnerek vizsgálata	65
8.3.	A DLC dimer-monomer átmenet szabályozó szerepe	66
8.4.	További kísérletek a DLC-vel munkacsoportunkban	68
9.	Köszönetnyilvánítás	69
10.	A dolgozat alapjául szolgáló közlemények.....	70
11.	Irodalomjegyzék.....	72
12.	Függelék.....	I

1. Rövidítések jegyzéke

3-AT = 3-aminotriazol

2YT = *E. coli* táptalaj

AEBSF = proteáz inhibitor, 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride

ATP = adenosin-trifoszfát

Bim és Bmf = egy BH3 (Bcl-2 homology 3) domént tartalmazó proapoptotikus fehérjék

CD = cirkuláris dikroizmus

DIC = dynein intermediate light chain (DYNC111 és DYNC112)

DTT = ditioneitol

EGTA = etilén-glikol-tetraecetsav (ethylene glycol tetraacetic acid)

FCS = Borjú szérum (Fetal Calf Serum)

HEPES = puffer, 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinétánszulfonsav

His-címke = 6 hisztidin a fehérjéhez fuzionáltatva

GST(-címke) = Glutation-S-Transzferáz (a fehérjéhez fuzionáltatva)

GTD = a miozin-5a globuláris farokrégiója (Globular Tail Domain)

L = létra

LiAc = lítium acetát

Leu-cipzár = dimerizációért felelős, minden hetedik pozícióban leucint tartalmazó szuper-szekunder fehérjeszerkezeti elem

MEM = tápoldat emlős sejteknek (Minimum Essential Media)

Ni-NTA = nikkelt komplexáló nitrilo-triacetát

nNOS = idegsejtekben előforduló NO-szintáz enzim

PAGE = poliakrilamid gélelektroforézis

Pak1 = p21-aktivált kináz 1

PBS = foszfát pufferolt sóoldat (Phosphate Buffered Saline)

PCR = polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)

PMSF = szerin proteáz inhibitor (fenilmetilszulfonilfluorid)

RT-PCR = RNS-alapú polimeráz láncreakció (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)

SDS = nátrium-dodecil-szulfát

SDUAK(H) = SD + Uracil, Adenin, Lizin, (Hisztidin); SD= Synthetic Defined Media

SER = sima felszíni endoplazmatikus retikulum

TCEP = redukálószer, (2-carboxyethyl)phosphine

TFE = trifluoroetanol

Tris = Trisz-(hidroxi-metil)-amino-metán

x-Gal = 5-bromo-4-chloro-indolyl- β -D-galactopyranoside

2. Összefoglalás

Dolgozatom témája az LC8 dinein könnyű lánc (DLC, DYNLL) vizsgálata volt, amely az eukariótákban előforduló egyik legkonzervatívabb fehérje. Szerkezetét tekintve a DLC homodimer; konszenzus kötőrégiót tartalmazó partnerfehérjei (>60) a dimerizációval létrejövő árokba kötődnek be. Doktori munkám során a konszenzus kötőrégiót nem tartalmazó miozin-5a és Pak1 (p21-aktivált protein-kináz) fehérjék DLC-hez való kötődését vizsgáltam meg alaposabban.

A miozin-5a pontos DLC kötőhelyét rövidebb miozin fragmentumok létrehozásával lokalizáltuk. Feltártuk a kötőhelyen belül található, mindössze 3 aminosav hosszúságú és korábban ismeretlen funkciójú, alternatívan kifejeződő ún. B exon szerepét. Ezt követően a DLC miozin kötőhelyét térképeztük fel leszorítási kísérletekkel melyek által bizonyítottuk, hogy a miozin-5a is a DLC dimer kötőárákába kötődik. Natív PAGE és ITC kísérletekkel megállapítottuk, hogy a miozin-5a – DLC komplex sztöchiometriája 2:2, azaz egy miozin dimerhez egy DLC dimer kötődik. Ugyanezen módszerekkel megmutattuk, hogy a dimer miozin fragmentumok kötődése jóval erősebb mint a monomer (peptid) ligandumoké, amit az aviditás jelenséggel magyarázunk. CD spektroszkópiával és limitált proteolízissel kimutattuk, hogy a DLC kötődése a miozin-5a mediális és disztális *coiled-coil* doménjeit stabilizálja; a miozin dimer mindkét szálához kötődve mintegy „molekuláris ragasztóként” tartva össze őket.

Néhány másik, eddig kevésbé vizsgált DLC kötőpartnerrel is végeztünk méréseket. Ezek közül az ATMIN a szekvenciája alapján jóslatokkal megegyezően több DLC kötőhelyet is tartalmaz, míg az Ikb α és a PKI α DLC-hez való kötődését – az irodalomban leírtakkal szemben – több módszerrel megvizsgálva sem tudtuk kimutatni.

A Pak1 DLC-kötő régióját leszűkítettük 26 aminosavra, és kimutattuk, hogy ez a fehérje szintén a DLC kötőárákába köt. Bizonyítottuk, hogy a kiindulási feltételezéssel ellentétben a Pak1 nem foszforilálja a DLC-t a Ser88-on. Vizsgálataink alapján a foszforilált DLC monomer állapotú, és csak dimer kötőpartnereihez képes kötődni, amikor is eltolódik a monomer-dimer egyensúlya a dimer állapot irányába.

Eredményeink arra utalnak, hogy a DLC kargó adapterként nem játszik szerepet a szállításban, ezzel szemben szerkezetstabilizáló, reguláló funkciója jelentős, chaperon-szerű csomóponti fehérjeként kötődve partnereihez.

3. Summary

The LC8 dynein light chain (DLC, DYNLL), the subject of my PhD thesis, is one of the most conservative eukaryotic proteins. It has a homodimeric structure, and its partner proteins containing the consensus binding sequence (more than 60) bind to the binding groove formed by the dimerization interface. The thesis focuses on those DLC binding partners that do not contain the consensus binding sequence, such as myosin 5a and Pak1.

Upon localizing the myosin 5a DLC binding site using truncated myosin fragments, the previously unknown role of the only 3-amino-acid-long alternative exon B was established. Using „pull-down” assays we demonstrated the binding of myosin 5a to the DLC binding groove. Native PAGE and ITC measurements showed that the stoichiometry of the DLC – myosin 5a complex is 2:2, i.e. one DLC dimer binds to one myosin dimer. The above measurements also revealed that the binding of the dimeric myosin fragments to DLC is much stronger than those of the monomeric (peptide) ligands. The latter was proved to be the consequence of avidity. CD spectroscopy and limited proteolysis experiments showed that the binding of DLC stabilizes the medial and distal coiled-coil domains of myosin 5a, acting as a “molecular glue” by holding together the two chains of the myosin tail region.

Some other interacting proteins of DLC were also examined in our binding studies. Among these, ATMIN has several DLC binding sites as predicted from its sequence, while, contrary to the published findings, we could not detect the binding of either I κ B α or PKI α to DLC, even by applying a variety of methods.

We narrowed down the Pak1 DLC binding region to 26 amino acids, and showed that Pak1 also occupies the canonical DLC binding groove. In contrast to the initial assumption, we demonstrated that Pak1 does not phosphorylate DLC on Ser88. Our experiments showed that the phosphorylated DLC is monomeric, and only its dimeric partners can bind to the monomeric form (by shifting the monomer-dimer equilibrium toward the dimeric state).

Our results suggest that DLC does not play a role as a cargo adapter; instead it has a role in stabilization and regulation of its binding partners as a „chaperon-like” hub protein.

4. Irodalmi összefoglaló

4.1. DLC

A DLC-t *Chlamydomonas*-ban, egy egysejtű zöldalgában fedezték fel az ostor dinein egyik könnyű lánc alegységeként. Innen ered a neve is: LC8 „dynein light chain” (csökkenő méret szerint a *Chlamydomonas* dinein 8. könnyű lánc alegysége). Később kiderült, hogy a citoplazmatikus dinein motor komplexnek is általánosan előforduló komponense a két másik dinein könnyű lánc alegységgel (TcTex és Roadblock) együtt. Közben mások az nNOS (idegsejtekben előforduló NO-szintáz enzim) inhibitoraként is leírták, és PIN (protein inhibitor of nNOS) néven hivatkoztak rá (Fan *et al.*, 1998). Más publikációkban DLC8 néven is szerepelt. A mára egységesített nevezéktan szerint (gerincesekben) a „dynein intermediate light chain”-hez (DIC azaz DYNC1I1 és DYNC1I2) kapcsolódó könnyű láncok közül az LC8 családba tartozóak neve DYNLL1 és DYNLL2*, a TcTex DYNLT1 és DYNLT3, az LC7 avagy Roadblock pedig DYNLR1, DYNLR2.

A DLC nagyon konzervatív fehérje. Gerincesekben két paralógja ismert (DLC1 és DLC2), amelyek között csak 6 aminosav eltérés van (a 89-ből), míg az eukarióta ortológok között (a *Chlamydomonas*, *C. elegans* és *Drosophila* DLC-t is figyelembe véve) 90% felett van a fehérjeszekvencia-azonosság. Szekvenciálisan nem, de térszerkezetét tekintve nagyon hasonlít a TcTex-hez is. Azaz a két dinein könnyű lánc homológ fehérje, közös ősök lehet (Williams *et al.*, 2005). Ez az evolúciósan konzervatív szekvencia és szerkezet természetesen nem véletlen; mutációja *Drosophila*-ban súlyos, morfogenetikus és idegrendszeri defektusokat okoz, valamint a nőstények sterilitását eredményezi. Teljes hiánya (knock-out) pedig apoptózison keresztül embrionálisan letális (Dick *et al.*, 1996). Genom szintű géncsendesítéses vizsgálatok *C. elegans*-ban is a dlc-1 gén esszenciális voltára utaltak (Kamath *et al.*, 2003). Saját, eddig még nem közölt RNS interferencia eredményink szerint (kollaboráció Vellai Tibor, ELTE Genetikai Tanszék munkacsoportjával) a *C. elegans* DLC fehérje hiánya pleiotróp fenotípust mutat (egyebek között morfogenetikai defektusokat, megnövekedett apoptózist, hibás pro-nukleusz vándorlást, sejtfüziós és neuron növekedési defektusokat).

* Dolgozatom a DYNLL1 és DYNLL2-ről fog szólni. Történeti okokból, illetve a könnyebb olvashatóság kedvéért DLC-ként (illetve ahol különbség van az ortológok között, ott DLC1 és DLC2-ként) fogok rájuk hivatkozni.

A DLC funkcióját tekintve számos feltételezés fogalmazódott meg és bukott el az újabb és újabb kötőpartnerek felfedezése, illetve a térszerkezetéről megjelent egyre több és pontosabb információ alapján. Ezeket a hipotéziseket, illetve irodalmi adatokat szeretném itt (némileg időrendbe is téve) összefoglalni. Részben azért, mert kutatásaink során mi is ezekből a munkahipotézisekből indultunk el, másrészt mert a kísérleteink eredményeképpen módosultak az elképzeléseink, amit a nemzetközi kutatások rendre igazoltak is. A dolgozatomban leírt eredmények is ezt az eseménysorozatot követik.

Espindola és mtsi. 2000-ben leírták, hogy az eddig a dinein könnyű láncaként számon tartott DLC kötődik a miozin-5a farokrégiójához is. Mivel mind a dineinek, mind a miozinok motorfehérjék – míg a dineinek a mikrotubulus mentén mozognak, addig a miozinok „sínje” az aktin filamentum –, ez a felfedezés lehetőséget adott új perspektívából megközelíteni a sejten belüli mozgatórendszereket. Ez az új perspektíva pedig a motorok által szállított kargóknak a mikrotubuláris és az aktin filamentum hálózat közötti potenciális átkapcsolódás lehetősége volt.*

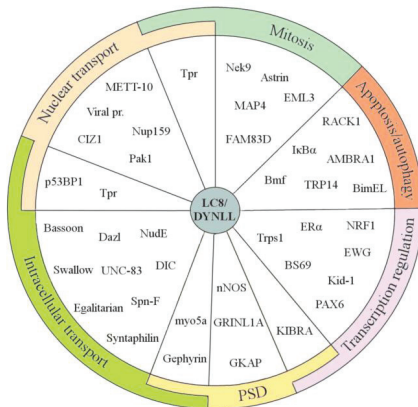
Az előbbiekben említettek szerint egyre több és több fehérjéről mutatták ki, hogy kapcsolódik a DLC-hez (1. ábra). A teljesség igénye nélkül tekintsünk át néhányat:

- Kötőpartnere az nNOS (idegsejtekben expresszálandó NO-szintáz), amely aktív állapotban dimerként fordul elő, de a DLC kötődés hatására monomerjeire esik szét és így inaktiválódik. Deléciós mutánsokat létrehozva egy 17 aminosav hosszú peptidre szűkítették le a kötőfelszínét, majd ezzel a peptiddel alkotott komplex térszerkezetét is meghatározták NMR spektroszkópiával, illetve röntgenkristallográfiával (ld. később; Fan *et al.*, 1998; Rodriguez-Crespo *et al.*, 1998).
- A DLC kötődik a Gephyrin-hez is (amely GABAerg gátló szinapszisokban található posztzinaptikus állványfehérje), miként az élesztő-két-hibrid rendszerben, és GST-„pull-down” kísérletekben, valamint emlős sejtekben kolokalizációs kísérletekkel kimutatták (Fuhrmann *et al.*, 2002). A DLC - Gephyrin komplex a dineinnel állhat kapcsolatban.
- Egy másik posztzinaptikus denzitasban megtalált DLC kötőpartner a GKAP (guanylate kinase domain-associated protein) a DLC2-vel kapcsolódott élesztő-két-hibrid rendszerben. Patkányagy extraktumból izolálva a komplexet az a GKAP-en és DLC2-n kívül a PSD-95-öt és a miozin-5-öt is tartalmazta (Haraguchi *et al.*, 2000; Naisbitt *et al.*, 2000).

* Mi ezen a ponton kapcsolódtunk be a DLC kutatásába.

Az itt felsorolt három DLC kötőpartner a posztzsinaptikus denzitásban található, azt sugallva, hogy a DLC-nek ezek motorfehérjéhez való kapcsolásában (szállításában) van szerepe.

- A Swallow fehérjének hasonló szerepét feltételezték a *bicoid* mRNS-hez való kötődése kapcsán is *Drosophila* oocytában (Schnorrer *et al.*, 2000). Wang és mtsi. kimutatták, hogy a DLC csak a Swallow fehérjéhez kötődik közvetlenül, az mRNS-hez nem (Wang *et al.*, 2004). A Swallow fehérjéről viszont kiderült, hogy az mRNS plazmamembránhoz kötésében van szerepe (Weil *et al.*, 2010). 2007-ben Benison és mtsi. is kimutatták, hogy a Swallow fehérje és a DIC ugyanazért a kötőhelyért verseng a DLC-n, így valószínűtlen a dinein szállító szerepe.



1. ábra: A DLC kötőpartnerei változatos sejtfunkciókban vesznek részt (Rapali *et al.*, 2011).

Néhány egyéb esetben is felmerült a DLC intracelluláris szállító szerepe, de eddig még csak a ko-transzportra akadtak bizonyítékok, a DLC-n keresztülli motorhoz való kötődésre nem. A magi transzportfolyamatoknál is jelen van a DLC, kötődik az

- ATMIN-hoz* amely egy ATM kölcsönható protein (Rapali *et al.*, 2011). Ez a kapcsolat azért különleges, mert az ATMIN sok tandem DLC kötőhelyet tartalmaz, de a pontos szerepe még nem tisztázott.

A transzkripció regulációjánál szintén nem tisztázott a szerepe, de

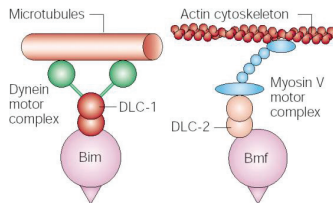
* Az ATMIN, mint kötőpartner első jellemzésében én is részt vettem, ld. Eredmények.

- Kötődik hozzá az emlős NRF-1 (nuclear respiratory factor-1), amely egy transzkripciós aktivátor, és a légzési lánc sejtmagban kódolt fehérjének expressziójában játszik szerepet (Herzig *et al.*, 2000).
- Az ER α -hoz szintén kötődik, és komplexként elősegíti annak magban való felszaporodását (Rayala *et al.*, 2005).

Sok vírusfehérje is kötőpartnere a DLC-nek, például

- Rabies vírus P protein, Mokola vírus P protein (Poisson *et al.*, 2001).
- African Swine Fever vírus p54 protein (Rodriguez-Crespo *et al.*, 2001).
- A herpeszvírusok kapszidjairól kimutatták, hogy a mikrotubulusok mentén negatív irányban mozognak a sejtmag felé. Ezt adenovírusokról is kimutatták, és dinein elleni antitesttel meggátolták a magba jutásukat (Martinez-Moreno *et al.*, 2003; Lo *et al.*, 2001)
- A human Foamy vírus Gag protein (retrovirális kapszid komponens) is a DLC segítségével jut el a centroszómába a vírusfertőzés korai szakaszában. Ezt immunprecipitációval és konfokális mikroszkópiával vizsgálták a DLC1-gyel kotranszfektált sejtekben.

Végül, de nem utolsósorban az apoptózisban is felmerült a szerepe; itt a transzporton kívül szekvesztráló funkciót is tulajdonítottak neki, mert kötőpartnerei közt találjuk a



2. ábra: A DLC1 és DLC2 szelektivitása sematikusán ábrázolva (Cory and Adams, 2002).

- Bim és Bmf proapoptotikus fehérjéket, melyeknek közös tulajdonsága, hogy tartalmaznak egy BH3 (Bcl-2 homology 3) domént, amellyel kötődni tudnak a Bcl-2 típusú antiapoptózis partnerükhöz. A citoszeleket érintő sejt sérüléskor a Bim és a Bmf felszabadulnak a motorfehérjékről, és bekapcsolják a sejt önpusztítását végrehajtó gépezetet. A Bim és Bmf más-más helyen lokalizálható a sejtben belül, és feltételezték, hogy más-más DLC is szállítja őket, mert *in vivo* a Bim szelektíven kötődött a DLC1-hez, a Bmf pedig a DLC2-höz (2. ábra). *In vitro* mindkettő köt mindkét izoformához, még hozzá ugyanakkora affinitással, ezért nem elképzelhetetlen,

hogy a sejten belül egy további fehérje felel a kötés specifikusságáért. A különböző stressz-szignálok sem egyformán hatnak rájuk; az *anoikis*-nek (a sejkontaktus megszűnése, amely az aktin citoskeletonra hat) például a Bmf-re van hatása, a Bim-re pedig nincs. Ez alapján feltételezték, hogy a Bmf a DLC2 dimeren keresztül a miozin-5-höz kötődve az aktin filamentumok mentén mozog, (és ezért hatott rá az *anoikis*), a Bim pedig a DLC1-en keresztül a dinein intermedier láncaihoz kapcsolódva a mikrotubulusok mentén közlekedik. A DLC-k sejten belüli szelektivitását a DLC1 (His41) és a DLC2 (Tyr41) mutánsainak előállításával támasztották alá. Ez a pozíció bizonyult döntőnek a miozinhoz, illetve a dineinhez való szelektív interakcióban, míg a két DLC-ben levő további 5 eltérő aminosav mutagenézisének nem volt hatása a kötődés szelektivitására *in vivo* (Puthalakath *et al.*, 2001; Day *et al.*, 2004).

- A DLC kötődik az I κ B α -hoz is, ezáltal gátolja a TNF α indukált NF- κ B aktivációját, mert ez utóbbi így nem tud kölcsönhatásba lépni az I κ B α -val (Herzig *et al.*, 2000; Crepieux *et al.*, 1997; Jung *et al.*, 2008).

A kötőpartnerek felsorolása néhány helyen már érintette a DLC1 és DLC2 közti különbséget; tekintsük át most ezt részletesebben is. A humán ortológok aminosavsorrendje közti 6 eltérést a 3. ábra mutatja.

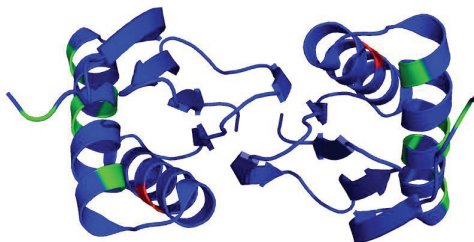
```

DLC1 MDRKAVIKNADMSEMQQDVIICATQAEKYNIEKDIAAIKKKEFDKKYNPTWHCIVGRNFGSYVTHETKHFIFYLGGVAILLFKSG
DLC2 MDRKAVIKNADMSEMQQDVIICATQAEKYNIEKDIAAIKKKEFDKKYNPTWHCIVGRNFGSYVTHETKHFIFYLGGVAILLFKSG
12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456789
1         2         3         4         5         6         7         8

```

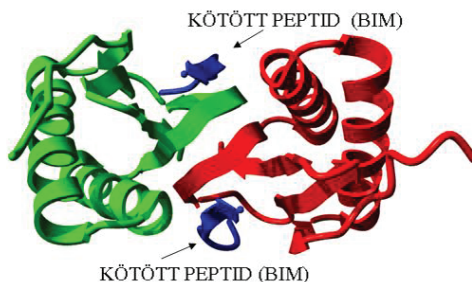
3. ábra: A DLC1 és DLC2 humán ortológok aminosavsorrendje közti 6 eltérés. A 41-es pozícióban levő hisztidin, illetve tirozin pirossal kiemelve.

Pirossal emeltem ki a szelektivitásban bizonyítottan különbséget okozó 41-es pozícióban levő hisztidint, illetve tirozint (Day *et al.*, 2004). Az irodalom nagyobb része nem tesz különbséget a DLC1 és DLC2 között. *In vitro* helyettesíthetőnek tűnnek egymással, *in vivo* pedig a DLC1-et találták meg a DIC és a Bim kötőpartnereként, a DLC2-t pedig a Bmf, GKAP és a számunkra különösen fontos miozin-5a partnereként. De mi lehet az oka ennek a nagyfokú hasonlóságnak, illetve miért egyedül a 41-es pozícióban levő eltérő aminosav különbözteti meg a fehérjéket partnereik számára? Következzék egy kis (tér)szerkezeti áttekintés.



4. ábra: DLC homodimer térszerkezete. Az ortológok közti szekvencia-eltérések az előző ábrával megegyezően pirossal és zölddel vannak jelölve.

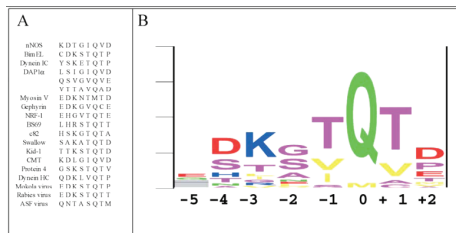
Az izolált emlős és *Drosophila* DLC szerkezetét ismerjük NMR és röntgendiffrakciós vizsgálatok alapján is (4. ábra). Egy rövid N-terminális β -láncot két α -hélix követ, amik a homodimer fehérje külső oldalán helyezkednek el. A dimerizációért egy 5 antiparallel láncból álló β -redő felel, amiből 4 lánc az egyik, 1 pedig a másik monomerhez tartozik (King, 2000). Savas közegben a dimer monomerekre esik szét, és pH 3-on már csak a monomer forma található meg (Wang *et al.*, 2003; Makokha *et al.*, 2004). Kötőpartnereivel (nNOS, Bim, Swallow, DIC, Pak1) komplexben vizsgálva bizonyítást nyert (Fan *et al.*, 2001; Liang *et al.*, 1999; Benison *et al.*, 2007; Lightcap *et al.*, 2008), hogy a ligandumok a DLC dimerizációja során kialakult kötőárok belsejéhez, illetve a második α -hélix N-terminálisához kötődnek, a DLC szimmetriájával megegyezően (5. ábra). NMR- és kristályszerkezetek összehasonlításából az is kiderült, hogy az apo állapotú DLC-ben a kötőárok körüli régióban nagyobb a térszerkezet belső mobilitása („konformációs légzés”), míg a komplexekre ez már kevésbé jellemző (Benison and Barbar, 2009; Fan *et al.*, 2002). Egyes ligandumok kötődésekor az árok kissé kinyílik, ami szintén a szerkezeti dinamika-változással függhet össze (Benison *et al.*, 2008).



5. ábra: A DLC – kötőpartner (Bim) komplex szerkezete (PDB: 1F95 alapján).

Bebizonyosodott tehát, hogy a DLC paralógok közti egyik eltérő aminosav sincs a kötőrégió közelében, ami egybeesik a DLC-k azonos viselkedésével *in vitro*, és megerősíti a feltételezést, hogy *in vivo* valószínűleg egyéb fehérjék játszanak szerepet a szelektivitásban.

De hogyan szabályozódik? Mi dönti el, hogy egy ennyiféle kötőpartnerrel rendelkező fehérje éppen melyikhez kötődjön, illetve hogy egy adott pillanatban kötődjön-e, vagy épp nem kötődjön? Vadlamudi és mtsi. 2004-ben kimutatták, hogy mellrák sejtekben a p21-aktivált kináz 1 (Pak1) foszforilálja a DLC1-et a Ser88-on, és ez a foszforiláció szükséges a sejt túléléséhez. (A Pak1 egy Ser/Thr kináz, amelyet a Cdc42 és a Rac aktivál, és a citoskeleton működésében, a sejtproliferációban, a sejt túlélésben, valamint az apoptózisban játszik szerepet.) Leírták, hogy a DLC1 és a Pak1 kolokalizálódik makropinocitotikus markerekkel (Yang *et al.*, 2005), és a DLC-t a foszforiláción keresztüli regulációja terápiás targetmolekulává teheti egyes mellrák típusok esetében (Song *et al.*, 2008). Yang és mtsi. a DLC-ből rövid egymást átfedő peptideket létrehozva kimutatták, hogy a Pak1 a DLC C-terminális részéhez kötődik a 70-89 aminosav között, és foszforilálja is azt (Yang *et al.*, 2005), míg a DLC1 Ser88Ala, illetve a DLC1 1-87 deléciós mutánt nem (Vadlamudi *et al.*, 2004). Mivel ez a DLC 70-89 régió önmagában nem dimerizálódhat, és kötőárkot sem tud kialakítani (30. ábra, pirossal kiemelve), felmerült a gyanú, hogy a Pak1 máshova kötődik a DLC-n, mint a partnerfehérjéi általában. Ezt alátámasztani látszott az a tény, hogy a Pak1-ben nincs meg a DLC kötőpartnerekre jellemző egyik konszenzus szekvencia sem.



6. ábra A DLC kötőpartnereinek kötőszekvencia-megoszlása (Lajoix *et al.*, 2004).

Mik a konszenzus szekvenciák? Kezdetben az addig kimutatott DLC-kötő fehérjék aminosav-sorrendjét elemezve, illetve *pepscan* technikával két konszenzus szekvenciát írtak le: a (K/R)XTQT-t és G(I/V)QVD-t amelyeket DLC-kötő motívumnak tekintettek (Rodriguez-Crespo *et al.*, 2001; Lo *et al.*, 2001). Akadt viszont néhány olyan fehérje, amelyről bizonyított volt, hogy kötődik a DLC-hez, viszont egyik konszenzus kötőhelyet sem tartalmazza (6. ábra). Ilyenek a Pak1-en kívül például az IκBα, a human Foamy vírus Gag

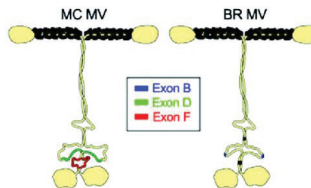
protein, és a számunkra kiemelt jelentőséggel bíró miozin-5a, mert ennek kapcsán kezdett kutatócsoportunk a DLC-vel foglalkozni.

4.2. Miozin-5a

A miozin-5a-t kalm modulinkötő fehérjeként fedezték fel csirke agyszövetből; később megtalálták egérben és élesztőben is. Hiánya egérben (*dilute*) világos szőrszínt valamint neurológiai problémákat okoz (Jenkins *et al.*, 1981), élesztőben a sejt polarításban és a membrán szállításban vált ki defektusokat. Emberben a ritka, recesszív Griscelli-szindróma egyik változatát okozza (Menasche *et al.*, 2003).

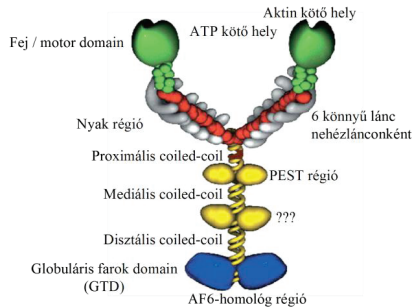
A humán genomban háromféle miozin-5 nehéz lánc gén található: a miozin-5a, -5b és -5c. Ezek különböző gyakorisággal fordulnak elő az eltérő szövet típusokban; neuronokban sok miozin-5a fejeződik ki, az 5b sokféle szövetben expresszálódik, az 5c pedig az epitélium sejtekre jellemző elsősorban (Rodriguez and Cheney, 2002).

A miozin-5a-nak többféle „splice” variánsa is ismert (7. ábra), mert az exon B, D és F alternatív módon expresszálódik a rúdrégió egy-egy peptidszakaszaként (Huang *et al.*, 1998; Lambert *et al.*, 1998a). A B exont tartalmazó splice variáns agyszövet-specifikus (Seperack *et al.*, 1995), melanocitákban a D exont tartalmazó izoformák a sejtmag körül és a Golgi régióban jellemzőek, az F exon pedig a melanoszómmakkal való interakcióhoz elengedhetetlen (Wu *et al.*, 2002; Westbroek *et al.*, 2003).



7. ábra: Különböző miozin-5 izoformák az alternatív exonjaikkal (MC = melanocita-, BR = agyszspecifikus) (Wu *et al.*, 2002).

A miozin-5 szerkezetét tekintve két nehéz láncból áll (8. ábra), melyek dimerizálódva egy kétféjű fehérjét alkotnak, amely három különböző régióra bontható (Cheney *et al.*, 1993; Langford, 2002): az N-terminális motor doménre, az azt követő rúdrégióra és a C-terminális globuláris doménre. A motor domén tartalmazza az aktin és az ATP kötőhelyét, utána jön a nyak vagy regulátor-régió a 6 könnyűlánc kötő motívummal, amiket IQ motívumoknak hívnak konszenzus szekvenciájuk miatt (IQXXRGXXR). Ezekhez kötődnek a kalm modulink és a miozin könnyű lánc is.



8. ábra: A miozin-5 felépítése (Langford *et al.*, 2002 alapján).

A proximális és mediális farokrégio α -héliceket tartalmaz, amelyek *coiled-coil* szerkezetű állnak össze, rövid, nem *coiled-coil* struktúrákkal megszakítva. Ez az ún. szegmentált *coiled-coil* régió kiemelt jelentőséggel bír kísérleteinkben. Proximális részén tartalmaz egy PEST-szekvenciát, amely a Ca^{++} függő kalpain hasítóhelye (Nascimento *et al.*, 1996). A disztális farokrégioiban pedig egy AF6-homológ régió található (*dilute* domén), ami fontos kapocs a sejt jelátvitel, a citoskeleton és a sejt-sejt interakciók között (Zhadanov *et al.*, 1999).

Funkcióját tekintve a miozin-5 processzív motorként (Vale, 2003; Sellers and Veigel, 2006) a rövidtávú transzportban játszik szerepet a sejtben; a farokrégio alapvető szerepe a kargókötés és az organelleszállítás (Evans *et al.*, 1998). A miozin-5 együtt tisztult szinaptikus vezikulákkal; immunprecipitációval kimutatták a kötődését szinaptikus vezikula-fehérjékhez, mint pl. a szinaptobrevin és a szintaxin (Karcher *et al.*, 2002). Ezen kívül asszociálódik a centroszómmával (Cao *et al.*, 2004), a Golgival és az arról leszakadt szekretoros vezikulákkal, a mitokondriummal, endoszómális vezikulákkal (Miller and Sheetz, 2000), az ER-rel (Takagishi *et al.*, 1996) és melanoszómmákkal is (Lambert *et al.*, 1998b). Ez utóbbi kettőre jó példa a *dilute* mutáció. A *dilute* egerek azért világosabbak a vad típusnál, mert melanocitáikban a melanoszóma a sejtmag körül tömörülnek, és nem szállíthatók a dendritokba, így nem kerülnek át a keratinocitákba (s a szőrszín melanin hiányában fehér marad). Emberben ez a Griscelli szindrómásokban van így, amihez még sokszor immundeficiencia és neurológiai szimptómák is kapcsolódnak. A *dilute* egerekben megfigyelt másik probléma, hogy a Purkinje sejtek dendritjeiből hiányzik a SER, amit szintén a miozin-5a szállíthat oda.

A kötődés a kargóhoz a G-fehérvékhez tartozó Rab-család tagjainak a segítségével történik. Mivel ezek vezikulaszpecifikusak, a miozin 5-höz való kargókötés is specifikus. Pl.: a Rab27a köti a miozin-5a-hoz a melanocitákat a melanoszómbákban (Wu *et al.*, 2001), a Rab11a köti az endoszómális vezikulákat a miozin-5b-hez (Lapierre *et al.*, 2001), a Rab8-at pedig a miozin-5c-hez kötődő vezikulákon mutatták ki (Rodríguez and Cheney, 2002).

A miozin-5a C-terminális globuláris farokdoménje vissza tud hajlani a fejhez (Liu *et al.*, 2006), így a fehérje „kikapcsolt” állapotba kerül. Ez azért fontos, mert a molekuláris motorok egy „sín” mentén haladnak a sejtben, kizárólag egy irányba (annak pozitív vagy negatív vége felé), ATP hidrolízisből nyerve energiát. Ez a „sín” a kinezin és a dinein esetében a mikrotubulus, amin előbbieket jellemzően a pozitív, míg utóbbiak kizárólag a negatív vége felé mozognak. A miozinok „sínje” ezzel szemben az aktin filamentum és a miozin-6 kivételével a filamentum pozitív vége felé mozognak rajta. Felmerül a kérdés, hogy az aktuális kargó leszállítása után hogy jutnak vissza a motorok a „sinen” a kiindulási pozícióba. Akár egy másik motor, akár a diffúzió szállítja vissza a miozin-5-öt a sejt középpontja felé a plazmamembrán közeléből, ez a miozin-5a kikapcsolt állapotában történik (Taylor, 2007; Trybus, 2008; Sellers, 2008). Ebben az inaktív konformációban a PEST régió körül mutatkozik szerkezeti átrendeződés (Li *et al.*, 2006), így tud a rúdrégió a fej felé visszahajlani (43. ábra).

Csirke miozin-5a izolálásakor találtak még egy könnyű láncot, amely kötődik hozzá, és amelyről kiderült, hogy azonos a 8 kDa-os dinein könnyű láncsal (Espindola *et al.*, 2000; Benashski *et al.*, 1997). Élesztő-két-hibrid módszerrel vizsgálva (Naisbitt *et al.*, 2000) kimutatták, hogy a miozin-5a rúdjaához mind a DLC1, mind a DLC2 kötődik, annak 1236-1420 aminosavai között. Ebben a régióban a miozin-5a-nak több szövetspecifikus *splice* variánsa is ismert (Huang *et al.*, 1998), de a kísérletben a DLC az agyra jellemző, az ABCEG exonokat tartalmazó izoformához kötődött (Naisbitt *et al.*, 2000).

Megjegyzés

Bár a DLC-vel történő kísérleteket egyedül kezdtem el a csoportban, a téma később nagyon szertedágazott; számos előremutató új kérdés merült fel, és többen is bekapcsolódtak a kutatásba. Így néhányszor előfordult, hogy az én előkísérleteim alapján megtervezett részletes mérést már más végezte. Ahol ezek az új adatok szervesen kapcsolódnak munkámhoz, illetve megerősítik vagy aláátaszadják korábbi eredményeimet, ott röviden feltüntettem e mérések eredményeit is, természetesen hivatkozással együtt.

5. Célkitűzések

Az irodalmi áttekintőben bemutatott DLC és miozin-5a fehérjék vizsgálata kapcsán a következő kérdésekre kerestem a választ:

1. Irodalmi adatok alapján csupán annyi volt ismert, hogy a DLC a miozin-5a farokrégiójához kötődik, így célom volt a **DLC2 kötőhely pontos lokalizálása a miozin nehézláncon, a kölcsönhatás sztöchiometriájának és kötési erősségének meghatározása, valamint a komplex szerkezeti vizsgálata.**
2. Meg szerettem volna tudni, hogy vajon a **miozin tudja-e szállítani a DLC, mint adapter segítségével a DLC egyéb kötőpartnereit** a sejtben.
3. A miozin rúdregiójának prediktált szerkezete szegmentált *coiled-coil*. Célom volt megvizsgálni, hogy **a DLC kötődésének milyen hatása van a miozin szerkezetére, és ennek milyen funkcionális következménye lehet.**
4. Már a kísérletek kezdetekor is számos fehérjéről kimutatták, hogy kötődik a DLC-hez. Így hosszabb távú céljaim közt szerepelt a miozin-5a-n kívül **további DLC kötőpartnerek vizsgálata**, különös tekintettel arra, hogy **mi lehet a közös bennük**, illetve mi jellemzi azokat a DLC-kötő fehérjéket, amelyek a miozinhoz hasonlóan nem tartalmazzák a konszenzus DLC-kötő motívumokat (ilyenek például az IκBα, PKIα és a Pak1), vagy éppenséggel többet is tartalmaznak (pl.: ATMIN).
5. Mivel a Pak1 nemcsak kötődik a DLC-hez, hanem irodalmi adatok alapján foszforilálja is azt a Ser88-as pozíciójában, célkitűzéseim között szerepelt megvizsgálni, hogy **ennek a foszforilációnak milyen (szerkezeti) hatása van a DLC-re.** Lehet-e ez egy szabályozási folyamat, azaz **a foszforilált DLC mutat-e különbséget kötési erősségben, illetve kötőpartnerekben** a nem foszforilált állapothoz képest?

6. Anyagok és módszerek

6.1. A DNS konstrukciók elkészítése

Kísérleteinkhez – a munkacsoportban új kutatási terület lévén – több mint 70 DNS konstrukciót készítettem el. Az alábbiakban fehéjre és felhasználási terület szerinti csoportosításban foglalom össze a dolgozatban szereplőket (részletesen ld. függelék I., IV. oldal). Az egyes mutánsokról – ahol szükséges – bővebb magyarázat az „Eredmények” fejezetben található.

Inszertek

A miozin-5a inszerteket egy kivétellel humán hasnyálmirigy cDNS könyvtárból (Stratagene) amplifikáltuk, a csak B exont tartalmazó agyi izoformából (Uniprot: Q9Y4I1-2); az M1ΔB+D fragmentumot pedig a D exont is tartalmazó izoformából készítettük. Az élesztő-két-hibrid rendszerben Naisbitt és mtsi. (2000) által kimutatott DLC-kötő régió pontosításához az irodalmi adatokkal megegyező (MV), illetve rövidebb, részben átfedő konstrukciókat készítettünk (M1, M11, M2, M3, M4, M6, M7, M8). A B exon szerepének bizonyítására az M7ΔB, M11ΔB és M1ΔB+D konstrukciókat, a miozin-5a – DLC komplex szerkezetvizsgálatára (kristályosítás) pedig hosszabb miozin konstrukciókat (MV1, MV2, MV4) készítettünk; egyet N- és C-terminális Leu-cipzárral fuzionáltatva a még nagyobb stabilitás érdekében (MV3). Az emlőssejtben expresszáltatott (MyoV-GTD és MyoVΔB-GTD) konstrukciók a miozin-5a teljes C terminálisát, a globuláris farokrégiót (GTD) is tartalmazzák (Kovács Erika konstrukciói). A peptidet Patthy András (ELTE Biokémiai Tanszék) szintetizálta nekünk.

A DLC2-t humán agykéregből izolált mRNS-ről (az agyszövetet Palkovits Miklós professzortól kaptuk) RT-PCR reakcióval állítottuk elő, a DLC1-et pET23b-be klónozva kaptuk Ignacio Rodríguez-Crespo-tól (Complutense University, Madrid). A Pak1-gyel történő DLC foszforiláció mimikálására az általánosan elfogadott Ser88Glu mutációt (DLC1-S88E, DLC2-S88E), illetve az irodalmi adatok alapján vele megegyezően viselkedő, de extra töltést nem hordozó deléciós mutánsokat (DLC1Δ2, DLC2Δ2) hoztunk létre. A DLC1-H41Y és DLC2-Y41H pontmutánsokat a Pak1 kináz *assay* során használtuk. A GenBank-ban találtunk egy harmadik DLC gént (DLC3), amit szintén vizsgálni terveztünk, azonban kiderült róla, hogy pszeudogén, így ezt a konstrukciót nem használtuk fel.

Az „*in vitro pull-down assay* – leszorítás” kísérletben, valamint NMR mérésekhez használt nNOS peptidet szintén Rodríguez-Crespo bocsátotta rendelkezésünkre, továbbá tőle származnak az *in vitro* kötővizsgálatokban felhasznált IκBα és PKIα klónok is.

Az ATMIN konstrukciókat élesztő miniprep DNS-ből amplifikáltuk, miután egy élesztő könyvtár szűrésével (Clontech, Matchmaker GAL4, Human Cardiac Library) fény derült a fehérje DLC-kötő képességére.

A Pak1 DLC-kötő régióját (204-281) Rakesh Kumartól (Anderson Cancer Center, Texas) kaptuk pGEX2T vektorban; erről készültek az élesztő-két-hibrid vizsgálatokhoz felhasznált deléciós mutánsok. A kináz aktivitás mérése során használt autoaktivált Pak1-T423E mutánssal (és a kísérlet elvégzésével is) Dr. Buday László segítette munkánkat.

A Bmf fehérjét kódoló DNS-t Hamsa Puthalakath (WEHI, Melbourne) bocsátotta rendelkezésünkre.

A konstrukciók elkészítése

A szekvenciákat bakteriális expresszióhoz pET15b (Novagen) és pGEX-4-T1 (Amersham) vektorba, az élesztő-két-hibrid vizsgálatokhoz pGAD és pGBT9 (Clontech), míg az emlős sejben végzett „*in vivo*” kísérletekhez pDsRed1-N1 (Clontech) és pEGFP-C1 (Clontech) plazmidokba klónoztuk be. A különböző vektorok által a fehérjékhez fuzionáltatott címkéket az 1. táblázat tartalmazza.

1. táblázat: A klónozásokhoz felhasznált különböző fúziós címkét tartalmazó vektorok

Vektor	Forgalmazó	Címke	Hasítóhely	Felhasználási terület
pET15b	Novagen	N-terminális His	trombin	<i>E.coli</i> expresszió
pGEX-4-T1	Amersham	N-terminális GST	trombin	<i>E.coli</i> expresszió
pGAD	Clontech	GAL4 Activating Domain	-	élesztő-két-hibrid rendszer
pGBT9	Clontech	GAL4 Binding Domain	-	élesztő-két-hibrid rendszer
pDsRed2	Clontech	N-terminális DsRed1	-	Emlős sejt expresszió
pEGFP-C1	Clontech	C-terminális GFP	-	Emlős sejt expresszió

Általában a restriktációs endonukleáz hasító helyét is tartalmazó oligonukleotiddal történt az inszertek amplifikálása, így közvetlenül a fenti expresszós vektorokba tudtuk őket ligálni. Néhány esetben azonban, főleg cDNS-ről vagy könyvtárból történt PCR reakció esetében, de például a genomi DNS-sel szennyezett élesztő miniprepből is, csak klónozó vektoron (pBluescript (Stratagene), pGMT (Promega)) keresztül tudtuk elkészíteni konstrukcióinkat.

A mutációk beviteléhez, illetve az exonok inszerciójához és deléciojához megaprimeres PCR-t használtunk, míg a C-terminálshoz közeli mutációknál a mutációt hordozó primerrel egy lépésben megoldható volt az amplifikáció. Az ATMIN élesztő miniprep esetében csak 3% DMSO jelenlétében, teljes hosszában anellálódó magas olvadáspontú oligókkal működött a PCR a genomi DNS szennyeződés miatt.

A kapott inszerteket és a hozzájuk tartozó vektorokat ezután restrikciós endonukleázokkal (leggyakrabban NdeI, BamHI, EcoRI, XhoI) emésztettük, majd hőinaktiválást és izolálást követően ligáltuk. A kapott ligátumokat klónozó sejtvonalba (XL1 Blue (Stratagene), DH5 α (Invitrogen), Top10 (Invitrogen)) transzformáltuk; a pozitív telepekből készült miniprepek minden esetben szekvenálásra kerültek.

6.2. A fehérjék elkészítése

Expresszió

Ebben a részben a bakteriális fehérjetermelést részletezem; az élesztő, illetve emlőssejtben történt expresszió leírása az „Élesztő-két-hibrid rendszer”, valamint a „Transzfekció és kolokalizáció” címszavak alatt található.

Az *E. coli*-ban expresszált fehérjékhez alapesetben BL21(DE3) sejtvonalat használtunk; az így nem expresszálódó (ritkább kodonokat is tartalmazó) konstrukciók esetében Rozetta, Rozetta pLysS és Codon⁺ sejtvonalak (Invitrogen) közül választottuk ki az adott esetben legmegfelelőbbet.

A fehérjék termelése 2YT táptalajon történt, a konstrukciótól függően 18 – 37 °C közötti hőmérsékleten, a megfelelő antibiotikumok (ampicillin, kloramfenikol) jelenlétében, IPTG-s indukcióval. NMR spektroszkópiához ¹⁵N (és ¹³C) izotópot tartalmazó minimál táptalajban növesztettük a sejteket; az expresszió hatékonyságát gélelektroforézissel ellenőriztük.

Fehérjék izolálása és tisztítása

Az expressziót követően a sejteket centrifugáltuk; és PBS-es mosást követően proteáz inhibitorok (és ciszteint tartalmazó fehérje esetén β -merkaptotanol) jelenlétében keses homogenizátorral és ultrahanggal tártuk fel. A DNS (és a sejttermelékek) sztreptomycin-szulfátos ultracentrifugálásos, illetve DNáz I-es eltávolítását követően, a felülúszóban maradt expresszált fehérjét a fúziós His- vagy GST-címke függvényében Ni-NTA, illetve glutation-Sepharose oszlopra kötöttük fel. A His-címkes fehérjéket ezután az adott oszloptöltethez

ajánlott imidazolos pufforsorozattal mostuk és eluáltuk; a GST-címkéseknél az elúció PBS-es mosást követően redukált glutationnal történt.

Az inklúziós testben termelődött His-címkés fehérjék esetében az expressziót követő feltárást guanidines (denaturáló) közegben végeztük, hogy a fehérje az oldat fázisba kerüljön. Ezután ultracentrifugálást követően ureát tartalmazó, csökkenő pH-jú pufforsorozatban történt az oszlopra kötés, mosás, majd az elúció.

A Bradford reagenssel, illetve SDS-gélelektroforézissel kiválasztott (a fehérjénkből sokat, szennyeződésből viszont keveset tartalmazó) elúciós frakciókat – dialízist követően – trombinos emésztésnek vetettük alá, amennyiben az izoláláshoz használt címkére a későbbiekben már nem volt szükség.

Ioncsere kromatográfia

A kötődésvizsgálatoknál alkalmazott fehérjéket ezután ioncseres kromatográfiával tisztítottuk tovább. Az „A” pufferbe (10 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,4, (ciszteint tartalmazó fehérje esetén 2 mM β -merkaptotanol)) átdializált, és 0,22 μ m-es filteren átszűrt fehérjéket HiTrap Q anioncserélő oszlopra (Amersham Biosciences) kötöttük fel szobahőmérsékleten az ÄKTA prime rendszerrel (Amersham Biosciences). Az oszlopon levő fehérjét „B” puffer (1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,4, (2 mM β -merkaptotanol)) gradienssel eluáltuk és 280 nm-es elnyelés alapján detektáltuk. A frakciókat SDS gélelektroforézissel ellenőriztük, majd a kiválasztott fehérjénket tiszta formában tartalmazó frakciókat a mintapufferbe (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,6, 3 mM Na-azid, 0,5 mM DTT) való dializálás után a megfelelő pórusméretű Amicon ultraszűrővel (Millipore) töményítettük.

Fehérjekoncentráció mérés

Elkészült fehérjénk koncentrációját az elméleti (becsült) moláris extrinkciós koefficiensük alapján (Pace *et al.*, 1995) UV-spektroszkópiával, illetve módosított Lowry módszerrel (Stoscheck, 1990) mértük meg.

6.3. GST-„pull-down” assay

Az *E. coli*-ban termelt GST-s fehérjénket centrifugálás után proteáz-inhibitorokat (0,5 mM PMSF, 20 μ g/ml pepstatin A, 20 μ g/ml leupeptin) és 2 mM β -merkaptotanol tartalmazó PBS-ben (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1,8 mM KH_2PO_4 , pH 7,3) szonikálással tártuk fel. Ismételt centrifugálást követően a különböző miozin-5a fragmentumokat tartalmazó sejtlizátum felülúszókat először DLC2-vel, majd (PBS-sel

egyensúlyba hozott) glutation-Sepharose (Amersham) gyönggyel inkubáltuk 30-30 percig szobahőmérsékleten. Kétszeri PBS-ses mosást követően redukált glutationnal eluáltunk, majd a különböző miozin fragmentumokat tartalmazó frakcióinkat 15%-os SDS poliakrilamid gélen megfuttattuk. A fent leírtak alapján a gélen megjelenő DLC sáv jelzi a kötődést.

A leszorításos kísérletben a mikrocentrifuga csőben levő glutation-Sepharose gyöngyökre felkötött GST-M7-DLC komplexet növekvő koncentrációjú (a DLC-hez képest molárisan 1:1, 10:1, 100:1 arányú) nNOS peptidet (EMKDTGIQVDRL) tartalmazó PBS-sel mostuk, majd a végén glutationnal eluáltuk. Az nNOS peptid méretéből adódóan ezeket a frakciókat tricines gélen futtatva tettük láthatóvá (Schagger and von Jagow, 1987).

6.4. Géliszűrés

A géliszűréseket Superdex 75 HR 10/30 és 200 HR 10/30 géliszűrő oszlopon (Amersham Biosciences) szobahőmérsékleten végeztük, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,6, 0,5 mM DTT összetételű mérőpufferben (későbbiekben: „géliszűrő puffer”), amit a mérés előtt átszűrtünk és légtelenítettünk. A monomer DLC vizsgálatánál citrát puffert (150 mM NaCl, 20 mM citromsav pH 3, 0,5 mM DTT) alkalmaztunk. A 0,5 illetve 0,75 ml/perc áramlási sebességet az LKB Bromma 2249 gradiens pumpa (Pharmacia) biztosította, a detektálás 220 és 280 nm-en történt LKB VWM2141 fotométerrel (Pharmacia). Az adott retenció időkhöz tartozó fehérje vagy komplex csúcs méretét az Amersham „low-molecular-weight” standardja alapján kalibráltuk (ld. függelék II. oldal). A fehérje térfogatok 5-50 μ l között voltak, és minden kötődésvizsgálatnál 20 perc preinkubáció előzte meg a minták oszlopra vitelét.

6.5. Cirkuláris dikroizmus spektroszkópia (CD)

A CD spektrumokat egy Jasco J720 spektropolariméteren vettük fel 190-250 nm-en (távolsági UV), illetve 250-300 nm-en (közeleli UV). A fénypáthossza a küvetében általában 1 mm volt. Kivételesen képez a 64 mM-os MV2 (ahol 0,1 mm-es), illetve a közeli UV-ban felvett spektrumok, ahol 10 mm-es küvetét használtunk, hogy a jelerősség a lineáris tartományon belül maradjon. A mérőpuffer 150 mM NaCl, 20 mM Na-foszfát pH 7,6, 0,5 mM DTT, illetve a DLC-S88E vizsgálatánál pH 3 citrát puffer volt. A fehérjekoncentráció 4-64 μ M között változott. Az 50% trifluoroetanolos (TFE) mérésnél 5 perc inkubáció előzte meg a spektrumfelvételt.

Az átfolyós rendszerű küvetákban a hőmérsékletet Neslab RTE-111 termosztáttal állítottuk be 20, ill. 25 °C-ra a spektrumfelvételeknél, a hődenaturációs kísérleteket pedig 5-80 °C között 1 °C/perc felfűtési sebességgel detektáltuk 220 nm-en. A felfűtések kivételével minden spektrum 3 mérés átlaga. A miozin fragmentumok DLC hatására történő szerkezetváltozásának vizsgálatakor a kapott komplex spektrumból kivontuk az önmagában mért DLC spektrumát, a többi esetben pedig a pufferral mért alapvonalat. A grafikonokon ábrázolt moláris reziduális ellipticitás értékeket ($[\Theta]$, (deg cm² dmol⁻¹)) a mért ellipticitás értékekből (Θ_{obs} , (deg)) kaptuk meg, az átlagos aminosav tömeg (MRW), a fényút hossza (l, (cm)) és a koncentráció (c, (mg/ml)) függvényében:

$$[\Theta] = (\Theta_{\text{obs}} * \text{MRW}) / (10 * l * c)$$

Az α -hélix tartalmat a kapott moláris reziduális ellipticitásból számoltuk a következő összefüggés szerint (Rohl and Baldwin, 1997):

$$\alpha\text{-hélix (\%)} = (-[\Theta]_{222 \text{ nm}} + 3000)/39000$$

Egyes esetekben a Dichroweb szerveren található CDSSTR programmal számoltuk az α -hélix tartalmat (Compton and Johnson, 1986).

A termodinamikai paramétereket a hődenaturációs kísérletek eredményeiből kaptuk meg (Greenfield *et al.*, 1998) cikke alapján a következőképpen:

Kétállapotú átmenetet feltételezve (amit a különböző hőmérsékleten felvett spektrumok egymásra illesztésén megfigyelhető izodikroikus pont alátámaszt, nem közölt ábra) a szerkezettel bíró miozin fragmentumok dimer (D), a szerkezetnélküliek pedig monomer (M) formában vannak jelen. A disszociációs (letekeredési) konstans ($K_d = [M]^2/[D]$) tehát a két frakció arányából számolható:

$$K_d = 2C_{\text{tot}} f_M^2 / (1 - f_M)$$

ahol C_{tot} az össz-fehérjekoncentráció; ezen belül a monomerek (denaturált fehérjék) arányát f_M jelöli.

Az adott hőmérsékleten mért ellipticitás (Θ_{obs}) a következőképpen függ a monomer frakció (f_M) arányától:

$$\Theta_{\text{obs}} = f_M[\Theta_M - \Theta_D] + \Theta_D$$

Θ_M és Θ_D a monomer és dimer frakció ellipticitása, és így természetesen függenek a hőmérséklettől. Változásuk a hőmérséklet függvényében lineárisnak tekinthető, ezért a következő egyenletekből számoltuk őket:

$$\Theta_D = \Theta_{D0} + \alpha T \quad \text{és} \quad \Theta_M = \Theta_{M0} + \beta T$$

ahol Θ_{D0} és Θ_{M0} a 0 Kelvinen levő elméleti ellipticitás; α és β pedig az egyenesek meredeksége, és így természetesen konstansok.

A disszociációs konstans (K_d) a hőmérséklettől és az össz-fehérjekoncentrációtól a következőképpen függ:

$$K_d = C_{\text{tot}} \exp \{ \Delta H (1/T_{\text{mobs}} - 1/T) \} / R$$

ΔH a van't Hoff entalpia az oladási hőmérsékleten (T_{mobs}), ahol $f_M = 0,5$, R pedig a gázállandó.

A szerkezetnélküli monomer és a natív dimer fehérjék közti csekély hőkapacitás-különbséget Greenfield (1998) cikke alapján mi is elhanyagoltuk. A fenti egyenletek alapján mérési pontjainkra görbét illesztve, valamint a

$$\Delta G = -RT \ln K \quad \text{és} \quad \Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

összefüggések felhasználásával kiszámoltuk a ΔG -t és ΔS -et, és ezzel megkaptuk a 3. táblázatban összefoglalt értékeket: a látszólagos oladási hőmérsékletet (T_{mobs}), a van't Hoff entalpiát (ΔH), a $\Delta G = 0$ -hoz tartozó oladási hőmérsékletet (T_m), ahol $K_d = 1$, valamint a 25°C és 37°C -hoz tartozó disszociációs állandókat ($K_{d(25^\circ\text{C})}$ és $K_{d(37^\circ\text{C})}$).

Az MV2 fragmentum koncentrációfüggésének vizsgálatokor (220 nm-en) kapott moláris reziduális ellipticitás értékekre szintén kétállapotú monomer-dimer átmenetet feltételező görbét illesztettünk.

6.6. Limitált proteolízis

Limitált proteolízis méréseinknél 20-60 μM MV2, M1 valamint M3 miozin fragmentumot emésztettünk önmagukban, valamint kétszeres mennyiségű DLC-vel történt preinkubálás után. Tripszinnel 0 °C-on vagy 20 °C-on (a miozinhoz képest 1:100 tömegarányban), Proteináz K-val 25 °C-on (a miozinhoz képest 1:400 tömegarányban), 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,6, 3 mM Na-azid és 2 mM β -merkaptotanol összetételű pufferben emésztettük a fragmentumokat. A megadott időközönként kivett mintákban a reakciót AEBSF-fel és forralással azonnal leállítottuk. A 17%-os Tris-glicin-SDS illetve Tris-tricin-SDS poliakrilamid gélre felvitt mintákat a GeneTools (SynGene) szoftver segítségével értékeltük ki, a gélre szintén felvitt fehérjelétrát használva kalibrációként. Az N-terminális peptid szekvenáláshoz nitrocellulóz membránra blottoltuk át mintáinkat.

6.7. Transzfekció és kolokalizáció

A transzfekciós és kolokalizációs kísérletek Schlett Katalin laboratóriumában és segítségével történtek NE-4C egér neuroektodermális sejtvonalon (Schlett and Madarasz, 1997). A GFP-DLC és B exont tartalmazó, illetve -mentes DsRed-miozin-5a DNS konstrukciókat Lipofectamine 2000 (Invitrogen) reagenssel transzfektáltuk az egér sejtvonalba (1 µg DNS / $7,5 \times 10^4$ sejt, illetve kotranszfekció esetén 0,5 + 1,5 µg plazmid + 2 µl Lipofectamine 2000). 6 órás inkubálást követően friss médium (MEM, 4 mM glutamin, 5% FCS, 40 µg/ml gentamicin) került rá további 18 órára, amit 4%-os paraformaldehides fixálás követett. A sejtmagok DRAQ5-al lettek megjelölve a Mowiol 4.88-as (Polysciences) beágyazás előtt. Az eredményt Olympus IX71 mikroszkóppal értékeltük ki, 60x-os nagyítású immerziós lencsével, 488, 546 és 633 nm-es lézerekkel, a FluoView500 szoftver segítségével.

6.8. NMR spektroszkópia

A DLC és DLC – miozin peptid (IQPKDDKNTMTDSTI) mágneses magrezonancia méréseket és kiértékelésüket Bodor Andrea végezte. A DLC térszerkezetének meghatározásához duplán jelölt (^{15}N , ^{13}C) rekombináns DLC-t állítottunk elő a 3D HNCA, HN(CO)CA és C(CO)NH korrelációs mérésekhez, míg a kötési (titrálós) kísérleteknél ^{15}N -jelölt DLC-t használtunk a „heteronuclear single-quantum coherence” (HSQC) spektrum felvételéhez. A DLC koncentráció a mérések alatt ~1 mM volt, amit ultraszűrőssel (Millipore Amicon Ultra 5K) értünk el. A mérőpuffer 20 mM NaCl, 0,04% Na-azid, 20 mM Na-foszfát volt, pH 7,6-on 2 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) mellett, 9:1 H₂O/D₂O aránnyal. A kötési kísérlet során először a kötőrégiót tartalmazó tömény (18 mM-os) miozin-5 peptiddel (IQPKDDKNTMTDSTI) titráltuk a DLC-t, egyenlő adagokban, az 1:1,25 DLC/miozin-5 arány eléréséig. Majd a kialakult komplexhez a továbbiakban egy másik DLC-kötő peptidet (nNOS; EMKDTGIQVDRL) adtunk, szintén 18 mM-os oldatból, a miozin peptiddel megegyező mólkoncentráció eléréséig („leszorításos kísérlet”).

6.9. Molekuláris dokkolás

A molekuláris dokkolás során három peptid DLC1-gyel való kölcsönhatását vizsgáltuk: a Bim-et (MSCDKSTQT) valamint egy B exont tartalmazó (Ac-PKDDKNTMTD-NMe) és egy nem tartalmazó miozin-5 peptidet (Ac-QPKNTMTD-NMe). Mivel a dokkolás nagy számítógépes teljesítményt igényel, ezért rövidebb peptideket használtunk a többi kísérletben felhasználtakhoz képest, viszont az eredmények így is valószínűsítik azt a

következtetésünket, hogy a DLC2 – miozin-5a peptid komplex szerkezete nagyon hasonló a kísérletesen meghatározott DLC1 – Bim peptid komplex szerkezetéhez (PDB: 1F95). A dokkolást – GROMACS (Lindahl *et al.*, 2001) programmal, vízmolekulák jelenlétében történt energiáminimalizálás után – az AutoDock 3.0 programmal (Morris *et al.*, 1998) végeztük, a korábban közölt beállításokkal (Hetényi *et al.*, 2003). A kiindulási szerkezet a DLC1– Bmf komplex NMR szerkezete volt (PDB: 1F95) a ligandum eltávolítása után. A kontroll Bim ligandum szimulációjánál a középső pentapeptidre (CDKST) számolva az rmsd (*root-mean-square deviation*) 3,1 Å volt, ami a korábbi NMR mérések alapján elfogadható deviáció érték. A ligandumok kötési affinitásának különbsége a molekulák közti interakciós energiákból lett becsülve (Fodor *et al.*, 2005). A futtatásokat Hetényi Csaba végezte.

6.10. Izotermális titrációs kalorimetria (ITC)

A kalorimetriás méréseket MicroCal VP-ITC műszeren 25 °C-on végeztük, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,6, 2 mM β-merkaptotanol, 3 mM Na-azid pufferben. A küvetében 56 μM volt a kiindulási fehérjekoncentráció, amit a 950 μM-os kötőpartnerrel titráltunk meg 1,6-szoros telítésig. Az MV2 miozin fragmentumot a DLC-vel, majd a DLC-t a szintetikus miozin peptiddel titráltuk. Mindkét kísérletben előzetesen felvettük a kiindulási fehérje hígulásából adódó hőmennyiség változást, és korrigáltuk vele adatainkat. A kapott pontokra legjobban az Origin for ITC 5.0 kiértékelő szoftver által ajánlott legegyszerűbb, egy kötőhelyes modell (A + B = AB) által számolt görbe illeszkedett, így ezt használtuk az adatok kiértékelésére.

A modell szerint az egy (vagy több azonos) kötőhelyet tartalmazó rendszerekben a kötődés alatt felvett, vagy leadott összes hő ($Q_{(i)}$) az alábbi képletből kapjuk meg (Anbzhagan *et al.*, 2011):

$$Q(i) = \frac{nP_i \Delta H V \left\{ 1 + \frac{X_i}{nP_i} + \frac{1}{nKP_i} - \left[\left(1 + \frac{X_i}{nP_i} + \frac{1}{nKP_i} \right)^2 - \frac{4X_i}{nP_i} \right]^{\frac{1}{2}} \right\}}{2}$$

ahol n a kötőhelyek száma, P_i az össz-fehérjekoncentráció, X_i az össz-ligandumkoncentráció, V a küvetta térfogata, K a kötési állandó és ΔH a kötési entalpia. Az adott injektálásra jutó hőt ($\Delta Q_{(i)}$) az aktuális ($Q_{(i)}$) és az előző ($Q_{(i-1)}$) totál hőmennyiségek különbségéből kapjuk meg a térfogatnövekedéssel (dV_i = injektálási térfogat) korrigálva az alábbiak szerint:

$$\Delta Q(i) = Q(i) + \frac{dV_i}{V_o} \left[\frac{Q(i) + Q(i-1)}{2} \right] - Q(i-1)$$

Az ITC készülék ezt a $\Delta Q_{(i)}$ értéket méri meg minden egyes injektálásnál, és kiértékeléskor ezekre a pontokra illeszti az előző két egyenletet az Origin a nemlineáris legkisebb négyzetek módszerét alkalmazva. Az így kapott közelítő értékeket (n , K és ΔH) addig helyettesíti vissza a függvényekbe iterálással, amíg a lehető legpontosabb eredményt megkapja.

Ezek ismeretében pedig a cirkuláris dikroizmus méréseknél is felhasznált egyenletekből megkapjuk ΔG -t és ΔS -t:

$$\Delta G = -RT \ln K \quad \text{és} \quad \Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

6.11. Natív PAGE

A natív PAGE kísérleteknél – a vizsgálni kívánt komplextől függően – mindig a nagyobb méretű komplexalkotóhoz adtunk molárisan kevesebb, azonos, valamint többszörös mennyiségeket a kötőpartner-fehérjéből, hogy jól látszódjon az esetlegesen megjelenő komplex sáv, majd 30 perc preinkubálás után 12-17 %-os (SDS-mentes) Tris-glicin poliakrilamid-gélben, jégbe állítva futtattuk meg mintáinkat. Így az M11-DLC komplex esetében 12 μM M11-hez $1/8$ -, $1/4$ -, $1/2$ -, $3/4$ -, 1-, 1,5-, 2- és 4-szeres molarányban adtunk DLC-t. Az S88 mutáns DLC $\Delta 2$ -vel végzett kísérleteknél az MV3-mal vizsgálva a DLC $\Delta 2$ arányát változtattuk, a DLC $\Delta 2$ – M6 kötési kísérletben pedig a miozinét. Az inkubáláskor 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,6 és 2 mM β -merkaptotanol összetételű puffert alkalmaztunk, a kiértékelés pedig a GeneTools (SynGene) szoftverrel történt, Coomassie Brilliant Blue festést követően. A sztöchiometria vizsgálatnál a komplex (a legélesebben futó) sáv denzitását ábrázoltuk a két fehérje arányának függvényében, kiszámolásához pedig a komplexben levő M11 arányra illesztettünk görbét a totál DLC koncentráció függvényében. A telítési görbéből a K_d -t is kiszámítottuk.

6.12. Szerkezet predikció

A miozin-5 farokrégio valószínűsíthető *coiled-coil* szakaszait a COILS és PAIRCOIL (Berger *et al.*, 1995) programokkal, az esetleges szerkezetnélküli régiókat pedig az IUPred (Dosztanyi *et al.*, 2005), PONDR (Li *et al.*, 1999) és GlobProt (Linding *et al.*, 2003) segítségével elemeztük. A másodlagos szerkezet elemzésére a PHD szervert (Rost and Sander, 1993) használtuk.

6.13. Analitikai ultracentrifuga

A foszforilált DLC negyedleges szerkezetének megerősítését szolgáló analitikai ultracentrifuga kísérleteket Walter Stafford (BBRI, Boston, USA) végezte el kérésünkre, egy Optima XL-I (Beckman Instruments) készüléken. Az optikai detektálás érzékenysége miatt a fehérjét a mérés előtt közvetlenül kellett átdializálni a 150 mM NaCl, 20 mM Na-foszfat pH 7,6 mérőpufferbe, ami referenciaként is szolgált a mérés alatt. A fehérjekoncentrációk 0,1-1 mg/ml között voltak. A látszólagos ülepedési állandók és molekulatömegek kiszámolása a SEDANAL programmal történt (Stafford and Sherwood 2004; Stafford 1994; Claverie *et al.* 1975; Claverie 1976).

6.14. Kináz aktivitás mérése

Konstitutívan aktív Pak1 T423E (Illes *et al.*, 2005) Lipofectamine-nal volt COS7 sejtbe transzfektálva, majd 48 óra múlva anti-Pak1 poliklonális antitesttel (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) immunprecipitálva, és protein A Sepharose-ra immobilizálva. A gyöngyök háromszori, 4 °C-on történt lízis pufferes mosását szintén háromszori, „kináz pufferes” (25 mM HEPES pH 7,4, 10 mM MgCl₂ és 0,5 mM EGTA) mosás követte. A gyöngyökhöz kötött Pak1 szétoztását követően minden egyes csőbe 5 µl foszforilálandó rekombináns fehérje került (DLC mutánsok, illetve H4 hiszton pozitív kontrollnak), valamint annyi kináz puffer, hogy 30 µl legyen a végtérfogatuk. A 100 mM (2 µCi [γ -³²P]ATP-t tartalmazó) ATP hozzáadását 30 perc inkubáció követte 25 °C-on. A reakció 10 µl 4x SDS mintapuffer hozzáadásával lett leállítva, majd a minták 15%-os SDS gélen lettek elválasztva. A beépült izotópokat autoradiográfia mutatta ki a gélek száradása után, 2-12 órás expozícióval. A kináz *assay* kísérleteket Dr. Buday László végezte.

6.15. Élesztő-két-hibrid rendszer és kék-fehér szelekció

Az élesztő-két-hibrid rendszerben végzett kötődésvizsgálatokat a Clontech vektoraival és kitjeivel, a Yeast Protocols Handbook (Clontech, PT3024-1) leírásait követve végeztük. A vizsgálni kívánt – és előzőleg pGBT9 (csali) illetve pGAD (próba) vektorba beklónozott – DLC konstrukció párokat a lacZ és HIS3 riporter géneket tartalmazó Y190 élesztő törzsbe transzformáltuk be a LiAc (lítium acetát) módszerrel (YEASTMAKER Yeast Transformation System, #K1606-1). A transzformált élesztőt SDUAKH (SD + Uracil, Adenin, Lizin (K), Hisztidin) hisztidint is tartalmazó minimál táptalajra szélesztettük. A pBGT9 vektor a triptofán, a pGAD pedig a leucin génjét tartalmazza élesztő szelekciós markerként, így

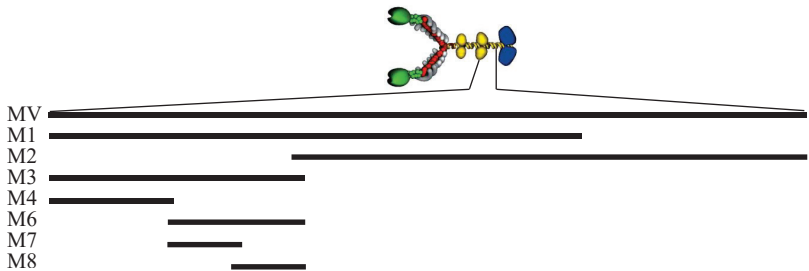
amennyiben először csak egyik plazmidaal transzformáltunk, a másik aminosavat a táptalajhoz adtuk. Miután a mindkét konstrukciót tartalmazó telepek kinőttek a lemezen (~3 nap, 30°C), a riporter gének segítségével teszteltük a csali- és a próbafehérje kötődését. Amennyiben SDUAK (hisztidin-mentes) táptalajra átváltva is kinőttek a telepek, a kötődés megerősítésére elvégeztük az α -galaktozidáz *assay*-t. Erre azért van szükség, mert a HIS3 riporter gén kismértékben indukció hiányában is termelődik, és a termelődés gátlására a táptalajhoz adott 3-AT (3-aminotriazol) pedig bomlékony, így fals pozitív eredményt adhat. Az α -galaktozidáz *assay*-hez Whatmann #5 filterrel sejtduplikátumot készítettünk, amit egy új lemezen 2-3 napig tovább inkubáltunk. A filteren felnőtt telepeket folyékony nitrogénnel permeabilizáltuk, majd az x-gal hozzáadását követő 30 perc inkubáció után bekékült kolóniákat fogadtuk el pozitív kötődésnek, mivel a későbbi kékülés szintén fals pozitív eredmény.

7. Eredmények

7.1. A DLC és a miozin-5a kölcsönhatása

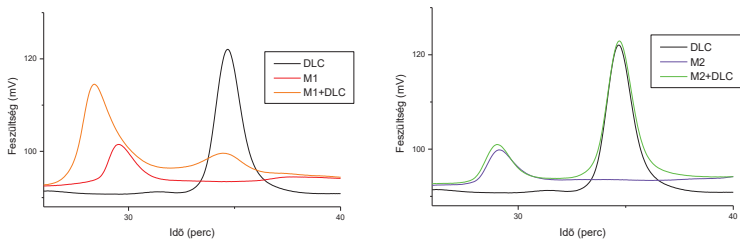
7.1.1. A DLC2 pontos kötőhelyének meghatározása a miozin-5a-n

A miozin-5a agyi izoforma pontos DLC-kötőhelyének meghatározásához az irodalomból ismert (1236-1420 aminosavak közti, Naisbitt *et al.*, 2000) kötőregióból kiindulva (MV) egymást átfedő, de egyre kisebb miozin-5a fragmentumokat készítettünk (ld. 9. ábra és függelék I., IV. oldal).



9. ábra: Az első néhány miozin-5a konstrukciónk.

Az elkészített nagyobb miozin fragmentumok (M1, M2) és a DLC kölcsönhatását először gélszűrőssel vizsgáltuk. Meglepődve tapasztaltuk, hogy míg a DLC dimer ott jött le az oszlopról, ahol vártuk, addig a miozin fragmentumok sokkal nagyobboknak mutatkoztak a valós méretüknél (10. ábra).

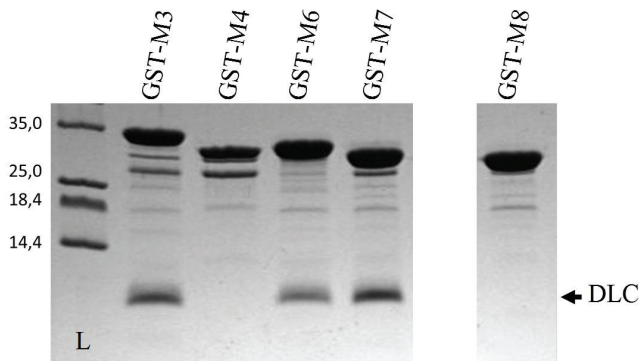


10. ábra: Az M1 és M2-es miozin fragmentumok DLC2-vel preinkubált keverékének gélszűrése Sephadex 200-as oszlopon, 280 nm-en. Az M1-es fragmentum (piros görbe) komplexet alkot a DLC-vel, míg az M2 (lila görbe) nem kötődik hozzá.

Az anomális viselkedés oka valószínűleg a bennük levő kiterjedt *coiled-coil* régió. Hasonló következtetésre jutottak a közelmúltban Wang és mtsi. egy másik *coiled-coil* DLC-kötő fehérjével, a Swallow-val (Wang *et al.*, 2004). Az a tény, hogy a DLC jelen körülmények között dimer, kétféleképpen igazolható: egyfelől a mérete a retenciós idő alapján kiszámolható (ld. függelék II. oldal), másfelől alacsony pH-n futtatva megnőtt a retenciós ideje (jobbra tolódott a csúcs), azaz szétesett monomerjeire (35. és 36. ábra^{*}).

A kromatogrammból jól látszik, hogy a DLC2 az M1-gyel komplexet alkot, az M2-vel pedig nem (10. ábra). A kalibráció alapján a retenciós időből kiszámolva az M1+DLC komplex méretét, az pontosan a DLC dimer méretével nőtt meg az M1-hez képest (ld. függelék II. oldal).

A gélszűréshez használt oszlopok méretbeli korlátai miatt a kisebb fragmentumoknál GST-„pull-down” assay-re váltottunk át. Ez a módszer azon alapszik, hogy a mátrixhoz kovalensen kötött redukált glutation nagy affinitással kötődik a glutation-S-transzferáz enzimhez. Ez utóbbihoz fuzionáltatva az interakcióban levő egyik fehérjét, a kötőpartnerre rajta keresztül szintén a gyantához kötődik. Onnan SDS kezelővel vagy glutationnal eluálva – komplex képződése esetén – SDS-poliakrilamid gélen láthatjuk a kötőpartner jelenlétét is.[†]



11. ábra: Különböző hosszúságú miozin konstrukciók DLC kötésének vizsgálata GST-„pull-down” assay-vel. A DLC az M3, M6 és M7 fragmentumokhoz kötődik, míg az M4-hez és az M8-hoz nem.

A gélszűrés eredménye alapján tervezett további miozin konstrukciókat (M3: az M1-nek az M2-vel nem átfedő része, illetve az azt kettévágya készült M4 és M6) tehát N-

^{*} Bővebben ld. „A Ser88 foszforiláció hatása a DLC-re” fejezet.

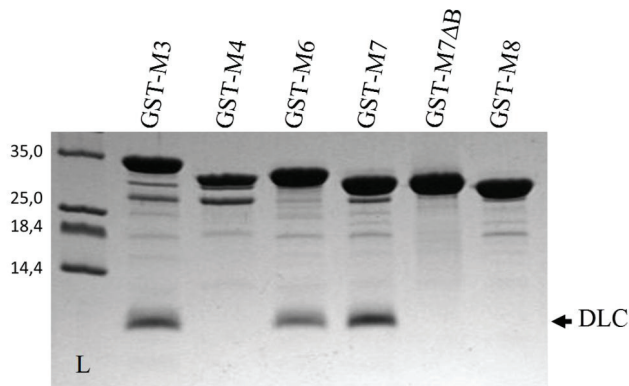
[†] A natív gél alapján történt kvantitatív kötéserősség-mérés az „A DLC – miozin-5a komplex sztöchiometriája és a kötés erőssége” fejezetben található.

terminális GST-címkével expresszáltuk. Az *in vitro* „pull-down” kísérletben a DLC kötődött az M3-hoz (ezzel megerősítve a gélszűrés eredményét), valamint ennek C-terminális „feléhez”, az M4-hez is (11. ábra). Ez utóbbit további két darabra vágva terveztük meg az M7 és az M8 konstrukciókat, ugyancsak GST-fúziós fehérjeként. Közülük – mint szintén a 11. ábra mutatja – az M7 tartalmazza a DLC2 kötőrégiót. A kontroll kísérletekben a GST-MV-hez és az GST-M1-hez is kötődött a DLC (ahogy vártuk), de a glutation oszlophoz továbbá a „sima” GST-hez nem (nem közölt ábra). Következtetésünk:

A DLC a miozin-5a farokrégiójának Ile1275-Ile1297-es régiójához kötődik.

7.1.2. A „B” alternatív exon szerepe a DLC2 kötődésében

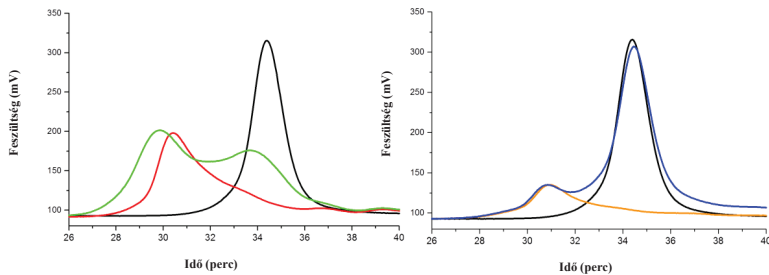
A GST-„pull-down” kísérletben M7-re leszükitett kötőrégió csupán 23 aminosav hosszú, viszont a közepén tartalmazza a mindössze 3 aminosavnyi, alternatívan kifejeződő és mindeddig ismeretlen szerepű B exont (AspAspLys). Tovább lépésként ennek az exonnak az esetleges DLC kötésben betöltött szerepét vizsgáltuk meg. Arra kerestük a választ, hogy mi történik, ha az alternatív exon nem fejeződik ki. Újjonnan létrehozott konstrukcióinkat az előző nomenklatúra alapján, de B exon nélkül, a „ΔB” végződéssel jelöltük.



12. ábra: A B exon hiányában a (GST-M7ΔB) a DLC nem kötődik az M7 miozin fragmentumhoz a GST-„pull-down” kísérletben (ld. még 11. ábra képaláírás).

Az újonnan tervezett, majd GST-címkével expresszált M7ΔB fehérjével megismételtük az előző kísérletet, kontrollként a többi GST-s konstrukciót használva. Mint a 12. ábra mutatja, a B exon hiányában a DLC2 nem kötődik a miozinhoz.

A kísérlet alapján szükségesnek láttuk egy hosszabb, szintén B exon nélküli miozin konstrukció elkészítését is eredményeink alátámasztására. Mivel az M7 fragmentum csak 23 aminosav hosszú, így esetlegesen előfordulhatott volna az is, hogy nem a B exon hiánya, hanem a megmaradó szekvencia rövideége az oka a negatív eredményeknek. Az M11-es szekvenciát választottuk erre a célra, és B exon nélküli változatban is elkészítettük. (Az M11 az M1-es fragmentumnál 18 aminosavval rövidebb; a kísérleti eredményeket és a miozin-fragmentumok között betöltött helyét tekintve azzal analóg, viszont stabilabb, kicsapódásra kevésbé hajlamos konstrukció, ld. limitált proteolízis kísérlet*). Az M11 tartalmaz egy szakaszt a disztális *coiled-coil* régióból (14. ábra), és a CD mérési eredményeink alapján (21. ábra/C.) dimer, és erősen köti a DLC-t.

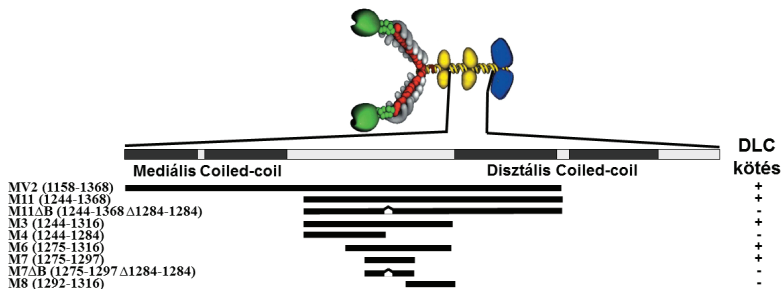


13. ábra: M11 és M11ΔB miozin fragmentumok DLC-vel preinkubált keverékének gélszűrése Sephadex 200-as oszlopon, 280 nm-en. DLC (fekete), M11 (piros), M11+DLC (zöld) valamint M11ΔB (sárga), M11ΔB + DLC (kék). A DLC (fekete) az M11-el (piros) komplexet alkot (zöld), de az M11ΔB-hez (sárga) nem kötődik (kék).

A 13. ábra mutatja, hogy az M11+DLC keverékben lecsökken a DLC csúcs, és megjelenik a komplex, míg az M11ΔB nem kötődött a DLC-hez (a mérés során DLC felesleget alkalmaztunk).

A B exon esszenciális szerepét a DLC kötésében cirkuláris dikroizmus spektroszkópiával is alátámasztottuk.* A 21./C. ábrán jelentős különbség mutatkozik az M11 konstrukció felfűtési görbéjében DLC hozzáadása nélkül, illetve annak jelenlétében. A 21. /D. ábrán viszont – ahol az M11ΔB látható ugyanebben a kísérletben – a két görbe teljesen egymásra fekszik, azaz a DLC jelenléte egyáltalán nem befolyásolja az M11ΔB szerkezetét, stabilitását. Tehát a DLC a B exon hiányában ebben a kísérletben sem kötődött a miozinhoz.

* Bővebben ld. „A DLC kötődésének hatása a miozin-5a szerkezetére, avagy a kötődés kiváltotta szerkezetváltozás” fejezet.



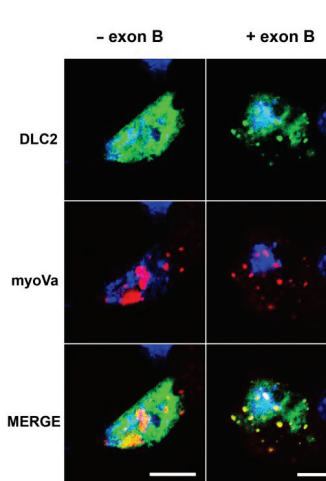
14. ábra: Különböző miozin-5a fragmentumok DLC kötése. A farokrégio szerkezetét PairCoil és IUPred programokkal jósoltuk; fekete: coiled-coil, világos szürke: rendezetlen régió.

Egy, a B exont nem, de a D exont vizont tartalmazó M1 méretű miozin szakaszt is (M1ΔB+D) leteszteltünk annak bizonyítására, hogy kizárólag a B exon felelős a DLC kötésért. A csak D exont tartalmazó M1ΔB+D fragmentum nem mutatott DLC-hez való kötődést natív gélen, gélzűrőssel, valamint CD spektroszkópiával sem.

Miután *in vitro* három különböző módszerrel is kimutattuk a B-exon jelenlétének szükségességét a DLC miozin-5a-hoz történő kötődéséhez, megvizsgáltuk, hogy *in vivo* is igaz-e ez a szerep. NE-4C egér neuroektodermális sejtvonalba transzfektáltuk* a GFP-fúziós DLC-t valamint a DsRed-fúziós miozin-5a fragmentumokat (\pm B exon) külön-külön, valamint együtt (Schlett and Madarasz, 1997).

Az ebben a kísérletben használt miozin fragmentumok nagyobbak az előzőeknél, a disztális *coiled-coil* utáni globuláris farokdomént is tartalmazzák (MyoV-GTD, MyoVΔB-GTD). A DLC önmagában transzfektálva egyenletes eloszlást mutat a sejtben, míg mindkét miozin-5a fragmentum pontszerűen helyezkedik el (enyhén aggregálódik is) a citoplazmában (nem közlő ábrák). A 15. ábra mutatja be a közös transzfektáció, a kolokalizációs kísérlet eredményét.

* Ezt a kolokalizációs kísérletet Németh Attila végezte.



15. ábra: GFP-DLC (zöld) kotranszekciója B exont tartalmazó illetve nem tartalmazó DsRed-miozin-5a (piros) fragmentumokkal. A B exon megléte esetén a DLC kolokalizálódik a miozinnal (a jobb alsó képen látható pontoknak megfelelő elhelyezkedést mutat mind a DLC, mind a miozin, önmagukban megvilágítva). A B exon hiányában nem történik kolokalizáció (a bal alsó képen látható nagyobb sárga foltok csak a miozin elhelyezkedését tükrözik, míg a GFP-DLC eloszlása egyenletes, ez pedig nem kolokalizációra, hanem a miozin aggregációjára utal).

A bal oldali oszlopban látható a B exon mentes kotranszekció eredménye. Mindkét fehérje az egyedi transzekciókor látható jellemző elhelyezkedést mutatja; egymásra téve a két képet nem mutatkozik interakció. Ezzel ellentétben a B exon-t tartalmazó DsRed-miozint kotranszektfálva GST-DLC-vel szembeötlő a különbség. A DLC ebben a kísérletben ugyanúgy pontszerűen helyezkedik el, mint a miozin, és egymásra téve a két képet látszik, hogy ezek a pontok ugyanoda esnek. Tehát *in vivo* is csak a B exont tartalmazó miozin-5a fragmentumhoz kötődik a DLC. Továbbá a DLC kötődése csökkenti a miozin aggregációját is, ami valószínűleg a szerkezetstabilizáló funkciójának tudható be*. Következtetésünk:

Az exon B (AspAspLys) esszenciális a DLC kötődéséhez mind *in vitro*, mind *in vivo*.

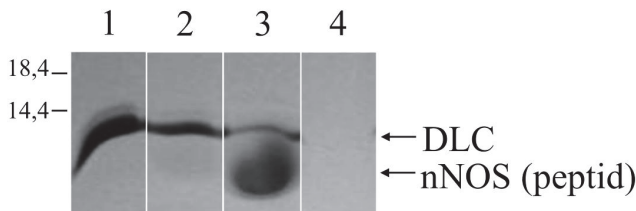
7.1.3. A miozin kötőfelszínének meghatározása a DLC-n

Az előbbiekben sikerült meghatározni a miozin-5a DLC-kötő régióját. Ebben a fejezetben pedig arra keressük a választ, hogy a miozin-5a hova kötődik a DLC-n. Ugyanoda-e

* Bővebben ld. „A DLC kötődésének hatása a miozin-5a szerkezetére, avagy a kötődés kiváltotta szerkezetváltozás” fejezet.

mint a többi DLC-hez kötődő fehérje, vagy esetleg máshova, mivel a miozin-5a DLC-kötőrégiója eltér a két eddig leírt konszenzus (K/R)XTQT vagy G(I/V)QVD szekvenciától.

Ennek bizonyítására először *in vitro* „pull-down” assay-vel megvizsgáltuk, hogy egy másik kötőpartnerrel leszorítható-e a miozin-5a fragmentum a DLC-ről.

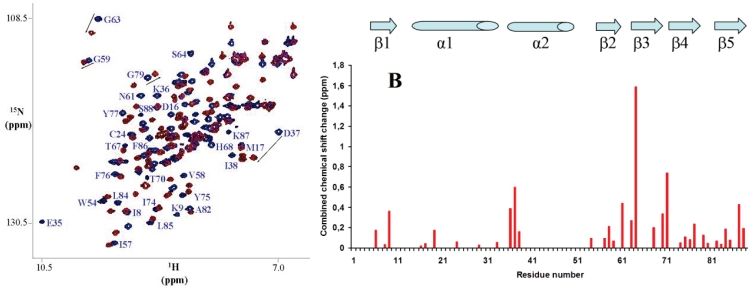


16. ábra: A miozinhoz (GST-M7) kötődő DLC elúciója egy másik DLC-kötő peptid, az nNOS hatására. Növekvő koncentrációjú nNOS peptiddel (1. csík 1x-es, 2. csík 10x-es, 3. csík 100x-os nNOS felesleg a DLC-hez képest) történő mosás hatására a felülúszóban megjelenő DLC látható SDS-poliakrilamid gélen megfuttatva. A 4. csík a leszorítást követő SDS mintapufferral történt elúciót mutatja; ekkorra már nem maradt a rendszerben DLC, mivel az nNOS az összeset leszorította a GST-M7-ről.

Preinkubált GST-M7 – DLC komplexet kötöttünk fel glutation-Sepharose gyöngyökre, majd ezt a rendszert inkubáltuk egymás után növekvő koncentrációjú szintetikus nNOS peptiddel (EMKDTGIQVDRL), ami a DLC-nek egy másik, a konszenzus kötőrégiót tartalmazó kötőpartnere (Fan *et al.*, 1998). Ebben a kísérletben a felülúszókat vizsgáltuk poliakrilamid gélelektroforézissel, hogy megjelenik-e bennük a DLC, azaz hogy a DLC kötőárkába bekötődő nNOS peptid képes-e leszorítani az M7 peptidet a DLC-ről. A 16. ábra mutatja a kísérlet eredményét: jól látszik, hogy már 1:1 aránynál is jelentős mennyiségű DLC szorítódik le az M7-ről. 100x-os nNOS felesleg az összes maradék DLC-t is leszorítja, mivel a 4., azaz az elúciós frakcióban már egyáltalán nem maradt DLC a rendszerben.

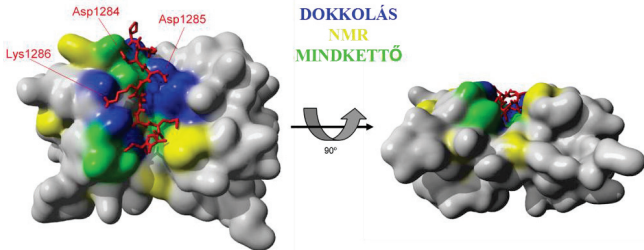
Ezt követően mágneses magrezonancia spektroszkópiával (NMR) tovább folytattuk a DLC miozin-5a kötőhelyének feltérképezését. A GST-„pull-down” kísérletek alapján szintetizált – az általunk feltételezett kötőrégiót tartalmazó – miozin-5a peptiddel (IQPKDDKNTMTDSTI; DDK = B exon) titrálunk a ¹⁵N-jelölt DLC-t*. A spektrum változásából (17. ábra) egyértelműen kiderül, hogy a peptid kötődött a DLC-hez. A DLC miozin-kötésben (közvetve vagy közvetlenül) érintett felszíni aminosavainak térbeli elhelyezkedését a 18. ábra mutatja.

* Az NMR vizsgálatokat Perczel András munkacsoportjában Bodor Andrea végezte.



17. ábra: ^{15}N -jelölt DLC2 és jelöletlen miozin-5a peptid (Ile1280-Ile1294, azaz IQPKDDKNTMTDSTI) komplexének HSQC spektruma (B) A kémiai eltolódás változása a DLC2-ben a miozin peptiddel való kötődés hatására.

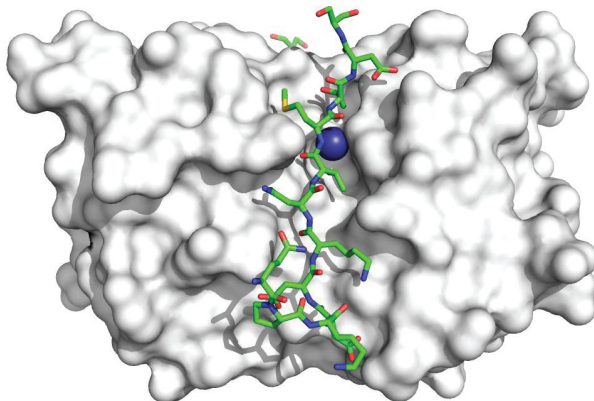
A DLC – miozin peptid komplexet ezután tovább titráltuk az előző kísérletben is használt nNOS peptiddel (EMKDTGIQVDRL), ám ez nem okozott további szignifikáns eltolódást a DLC spektrumában. Ez kísérletileg is megerősítette, hogy azonos kötőhelyért verseng a miozin-5a és az nNOS a DLC felszínén. A szabad és komplexben lévő DLC eltolódásait összevetve az irodalomból ismert hasonló vizsgálatokkal más DLC-kötő peptidek esetén (Day *et al.*, 2004) megállapítható, hogy a miozin-5a peptid a DLC ismert kötőárákába kötődik (5. ábra). Az NMR spektrumokból ezen kívül a DLC-ben található egyetlen triptofán (W54) kémiai környezetének a megváltozása is látszik, amit ki tudunk használni a kötődés fluorimetriás, majd később megállított áramlásos fluoreszcens spektroszkópiás (*stopped-flow*) méréséhez.*



18. ábra: Az exon B interakciói a DLC-vel. Sárgával az NMR-ben, kézzel a dokkolásban, zölddel pedig a kötésben mindkét módszer szerint érintett aminosavak vannak kiemelve.

* Bővebben ld. „A DLC – miozin-5a komplex sztöchiometriája és a kötés erőssége” fejezet.

Az NMR vizsgálatokkal egyidőben *in silico* is elemeztük*, hogy a miozin-5a milyen konformációban kötődhet be a DLC kötőárákába, és ott mely aminosavakkal létesíthet kapcsolatot. A dokkolás memória- és időigényes volta miatt itt az NMR méréshez képest egy rövidebb miozin peptidet (PKDDKNTMTD), valamint ennek B exon nélküli variánsát (PKNTMTD) választottuk; kontrollként pedig a DLC-hez bizonyítottan ismert szerkezettel kötődő Bim peptidet (SQEDKATQTL) használtuk. Az NMR vizsgálat és az *in silico* dokkolás eredményeit a 18. ábra foglalja össze.



19. ábra: A DLC — miozin peptid (IQPKDDKNTMTDST) kristály röntgendiffrakcióval meghatározott szerkezete. (Radnai László kristálya és ábrája).

Mindkét kísérletből jól látszik, hogy a miozin-5a peptid is a DLC kötőárákába köt, az eddig ismert kötőpartnerekhez hasonlóan. A két ábrát összehasonlítva szembetűnő, hogy a B exon aminosavainak (DDK) pozícióját sikerült a legfontosabban modellezni, ami megerősíti a kötésben játszott esszenciális szerepét. A különbségek okára pedig a későbbiekben Radnai László kollégám által előállított DLC – miozin peptid kristály röntgen-diffrakcióval meghatározott szerkezete (19. ábra) mutatott rá, ahol a kristályosított komplexben a miozin DLC-kötő motívuma alatt egy szerkezeti víz látható.† Ezt a DLC kötőárákában ülő vizet a dokkolásnál nem vettük figyelembe, viszont az NMR spektrum eltolódásaiba beszámít, azaz ott láthatatlanul, de jelen van. Következtetésünk:

A miozin-5a a DLC kötőárákába köt, megegyezően a DLC többi kötőpartnerével.

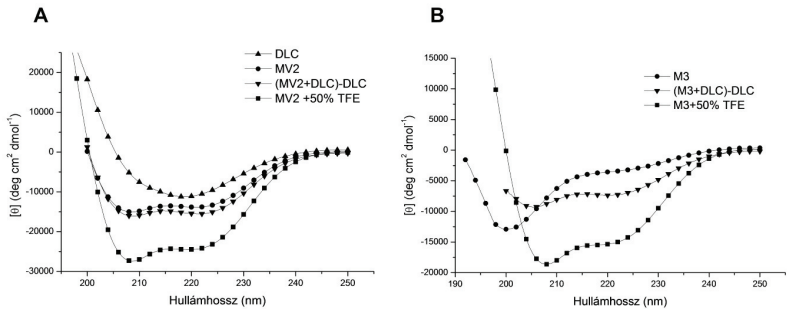
* Az *in silico* dokkolást Hetényi Csaba végezte.

† A kristályszerkezet részletes elemzése Radnai László doktori disszertációjában olvasható.

7.1.4. A DLC kötődésének hatása a miozin-5a szerkezetére, avagy a kötődés kiváltotta szerkezetváltozás

A kötődésvizsgálatok közben feltűnt, hogy a miozin fragmentumok DLC-vel alkotott komplexei sokkal stabilabban viselkednek, mint a miozin fragmentumok önállóan; ami arra engedett következtetni, hogy a DLC kötődése stabilizálja a miozin szerkezetét. Következő vizsgálatainkkal ennek a lehetőségnek jártunk utána.

A cirkuláris dikroizmus képes egy-egy nagyobb fehérje szerkezetéről is viszonylag gyorsan információt nyújtani. A cirkulárisan elforgatott fény a távoli UV tartományban (170-260 nm) a fehérjén belüli másodlagos szerkezetekről ad információt (α -hélix (222 nm), β -redő, random coil (<200 nm), illetve az esetünkben nagyon fontos *coiled-coil* régiók (222/208 nm)). A kapott spektrumok dekonvolúciójával meghatározható az egyes szerkezeti elemek egymáshoz viszonyított aránya is. Közele UV tartományban (260-320 nm) pedig a fehérjék negyedleges szerkezetéről kaphatunk információt az aromás aminosavak aszimmetrikus környezete alapján, mivel ezek érzékenyek a szerkezetváltozásra. CD méréseinket az M3, M11, M11 Δ B és MV2 miozin fragmentumokkal végeztük.



20. ábra: Különböző miozin fragmentumok szerkezetváltozása a DLC kötődés hatására. Távoli UV spektrum az MV2-ről (A) és az M3-ról (B) a DLC-kötés előtt és után, illetve 50% trifluoroetanolban (a DLC2 spektrumát - mivel az nem változik - az összegből kivontuk).

A méréseinkben szereplő humán DLC2 távoli CD spektruma (20. ábra/A.) egy tipikus α/β fehérjét mutat, és megegyezik a korábban leírt *Drosophila* DLC szerkezetével (Barbar *et al.*, 2001). A szintén ezen az ábrán látható – a szerkezet predikció alapján N- és C-terminálisan is *coiled-coil* régiót tartalmazó – MV2 miozin fragmentum 208-as, valamint 222-es dupla minimuma megerősíti a feltételezett *coiled-coil* szerkezetet, mivel $\theta_{222}/\theta_{208} \approx -1$ (Lau *et al.*, 1984). A DLC kötődése esetén a θ_{222} érték negatívabb lesz, azaz nő a fehérje hélix

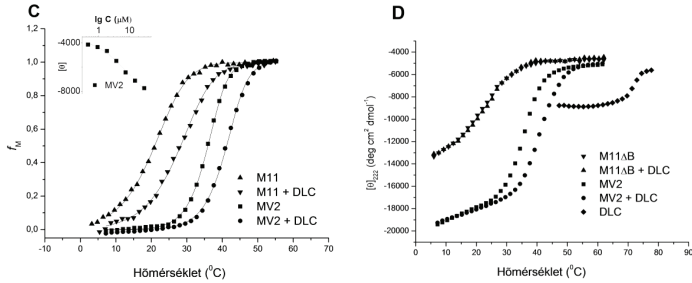
(azaz esetünkben a *coiled-coil*) tartalma. A DLC másodlagos szerkezete apo illetve peptid-kötött állapotban megegyezik (Fan *et al.*, 2001), így a grafikonokon látható DLC-vel együtt mért miozin fragmentumok esetén az apo DLC spektruma kivonható volt, és kivonásra is került a komplexéből. Ezen miozin fragmentumok önállóan, illetve a DLC kötődése után számolt hélix tartalmát a 2. táblázat mutatja. A 100% α -hélix tartalomnak az 50% TFE-ben mért értéket vettük Sonnichsen és mtsi. 1992-es munkája nyomán. Az MV2 esetében a 222 nm-en mért ellipticitás megnőtt, és a $\theta_{222}/\theta_{208}$ érték jóval 1 alá csökkent, ami arra utal, hogy a *coiled-coil* szerkezetből egyszálú α -hélix alakult ki (20. ábra/A.).

Az M3 fragmentum (ami a két *coiled-coil* között lévő nem *coiled-coil* DLC-kötő régió) CD spektruma 200 nm-es minimumával egy elsődlegesen szerkezetnélküli struktúrát mutat (20. ábra/B.), amit NMR proton spektrum mérésekkel is megerősítettünk (nem közölt ábra). A DLC hozzáadásakor a CD spektrum erősen eltolódik és dupla minimuma lesz 206 és 222 nm-en, ez – az 50% TFE hozzáadásával mért 100% α -hélikális szerkezet alapján kalkulálva – hozzávetőleg 10% szerkezetnövekedésre utal, ami átlagosan és körülbelül 8 aminosavnyi α -hélix kialakulásának felel meg (2. táblázat).

2. táblázat: A DLC kötődés hatása különböző miozin fragmentumok α -hélix tartalmára (CD spektrumból dekonvolált értékek).

Fragmentum	Kalkulált α -hélix tartalom	DLC kötésekor a hélix tartalom növekedés	Kalkulált hélix „feltekeredés” (db. aminosav)
MV2	~ 42%	~ 4%	~ 10
M11	~ 20%	~ 10%	~ 13
M2	~ 45%	(Nem kötődik)	(Nem kötődik)
M3	–	~ 10%	~ 8

A moláris ellipticitás hőmérsékletfüggő változásának 222 nm-en való követésével („felfűtés”) információt nyerhetünk a fehérjében melegítés hatására bekövetkező szerkezeti átalakulásról. A szerkezettel rendelkező miozin fragmentumaink spektruma a melegítés hatására 203 nm felé tolódott, és eltűnt a 208 és 222 nm-es dupla minimum, ami kétállapotú (*two-state*) *coiled coil* \rightarrow *monomer random coil* modellnek feleltethető meg (azaz egyszálú α -hélix intermedier nincs). Ez a szerkezeti átmenet viszonylag alacsony hőmérsékleten (20–40 °C között) következik be (21. ábra/C.), és reverzibilis, szemben a DLC magas hőmérsékleten (72 °C) történő irreverzibilis denaturációjával. Utóbbi viszont így lehetőséget teremt arra, hogy 60 °C alatt – a számunkra fontos mérési tartományban – a DLC ellipticitásértékét problémamentesen kivonhassuk az összegből, mivel az nem változik (21. ábra/D.).



21. ábra: A DLC kötés stabilizáló hatása különböző miozin fragmentumok esetében. (C) Az M11 és MV2 fragmentumok monomer frakciójának aránya (f_M) a hőmérséklet függvényében DLC nélkül, illetve jelenlétében. (D) Az M11ΔB és MV2 fragmentumok 222 nm-en mért ellipticitásának hőmérsékletfüggése DLC hozzáadása előtt és után, valamint a DLC önmagában (mivel ez utóbbi 60°C alatt nem változik így az összegekből kivontuk). (C belső grafikon) az MV2 ellipticitásának koncentráció-függése 37°C-on.

A hődenaturációs kísérletekben kapott mérési pontokra illesztett görbéből – kétállapotú kooperatív átmenetet feltételezve (Greenfield *et al.*, 1998, ld. anyagok és módszerek) – megkapható a különböző miozin fragmentumok látszólagos olvadáspontja (T_{mobs} , ahol $f_M=0,5$), van't Hoff entalpiája (ΔH_V) és disszociációs konstansa (K_d) a DLC jelenlétében, illetve nélküle (3. táblázat). A kétállapotú kooperatív átmenetet azzal is igazoltuk, hogy a T_m ($\Delta G = 0$) érték nem koncentrációfüggő; az MV2 esetében $T_m = 58,7 \pm 0,7$ °C (4–64 μM között, 3. táblázat). Feltételezésünk helyességét szintén alátámasztja, hogy a hődenaturációs kísérletből számolt disszociációs állandó ($K_d = 29$ μM) egybevág a koncentrációfüggés vizsgálatából kapott értékkel ($K_d = 17$ μM , 21. ábra/C., belső grafikon). A felfűtési görbéken a szabadon levő *coiled-coil* végek miatt pretranzíciós eltolódás látható (Dragan and Privalov, 2002). Ezt úgy vettük figyelembe, hogy rájuk, illetve a poszt-tranzíciós pontokra is (amely az ellipticitás hőmérsékletfüggéséből adódhat) egyenest illesztettünk a számolásnál. A szemléltetés kedvéért a 21./D. ábra a hőmérséklet függvényében ábrázolja az M11ΔB és MV2 fragmentumok hődenaturációját, valamint a DLC-t, míg a 21./C. ábrán látható görbék normáltak, azaz a monomer frakció aránya látható az adott hőmérsékleten. Az M11-es fragmentum olvadáspontja ($T_{\text{mobs}} = 20,9$ °C) DLC hozzáadásának hatására 7,3 °C-al nőtt, míg a B-exon-mentes M11ΔB olvadáspontjának értéke nem változott. Ez utóbbi mérés nemcsak alátámasztja a B exon DLC kötésben nélkülözhetetlen szerepét, hanem egyúttal belső kontrollként is funkcionál a CD spektroszkópiás kísérleteink pontosságát illetően, mivel a két görbe teljesen egymásra fekszik (a DLC „alapvonal” kivonása után). Az N- és C-terminális *coiled-coil*-t is tartalmazó MV2 fragmentum olvadáspontja DLC nélkül is

magasabb az előbbi értékeknél ($T_{\text{mobs}} = 36,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$), de itt is jelentős szerkezetstabilizálódás mutatható ki DLC jelenlétében, hiszen $5,1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ -ot tolódik el az olvadáspontja (3. táblázat).

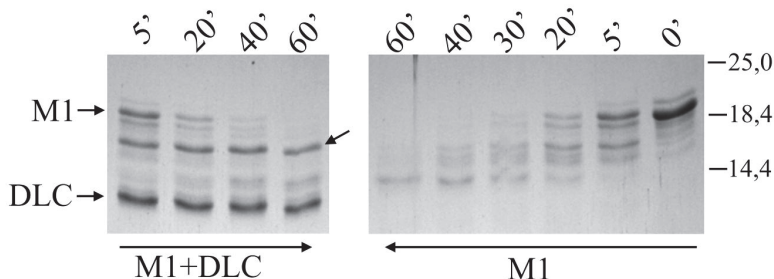
3. táblázat: Különböző miozin-5a konstrukciók „letekeredésének” (disszociációjának) cirkuláris dikroizmus spektrumokból számolt termodinamikai paraméterei. (T_{mobs} : látszólagos olvadáspont; ΔH_V : van't Hoff entalpia; $T_m(\Delta G=0)$: $\Delta G = 0$ -hoz tartozó olvadáspont; K_d : 25°C , illetve 37°C -hoz tartozó disszociációs állandó.) Ezek az értékek az ellipticitás 222 nm -en mért hőmérsékletfüggéséből lettek kiszámolva, kivételt képez a #-tel jelölt érték, ahol az ellipticitás 222 nm -en mért koncentrációfüggéséből számoltunk. A nem jelölt esetekben a fehérjekoncentráció $16 \text{ } \mu\text{M}$ volt. Méréseink pontosságát igazolja, hogy a $\Delta G = 0$ -hoz tartozó olvadáspont értéknek nincs kimutatható koncentrációfüggése (MV2, $4\text{--}64 \text{ } \mu\text{M}$).

	T_{mobs} ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH_V (kJ/mol)	$T_m(\Delta G=0)$ ($^{\circ}\text{C}$)	$K_d(25 \text{ }^{\circ}\text{C})$ (μM)	$K_d(37 \text{ }^{\circ}\text{C})$ (μM)
M11	20,9	220	62,3	53	>1000
M11 + DLC	28,2	228	70,0	6	213
MV2	36,0	402	59,3	0,03	$29 (17)^{\#}$
MV2 + DLC	41,1	384	66,5	0,004	2
M2	36,3	366	62,5	0,06	13
MV2 ($4 \text{ } \mu\text{M}$)	34,8	450	57,7	–	–
MV2 ($64 \text{ } \mu\text{M}$)	38,6	379	59,3	–	–

A disszociációs állandókat tekintve az MV2 fragmentum szobahőmérsékleten már mikromólos koncentrációban is stabil dimer ($K_d(25 \text{ }^{\circ}\text{C}) = 30 \text{ nM}$ DLC nélkül, és $K_d(25 \text{ }^{\circ}\text{C}) = 4 \text{ nM}$ DLC jelenlétében). $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ -on viszont már sokat számít a DLC jelenléte, ugyanis $29 \text{ } \mu\text{M}$ -ról $2 \text{ } \mu\text{M}$ -ra csökkenti le a disszociációs állandót, azaz mintegy 15-ször stabilabbá teszi a mediális és a disztális *coiled-coil* régiót (3. táblázat), aminek a motorfehérje szabályozásában lehet jelentősége.* A kizárólag a disztális *coiled-coil*-t tartalmazó M11-es fragmentum már szobahőmérsékleten és DLC jelenlétében is gyengébb dimer, ám ennek kevésbé van gyakorlati jelentősége. Érdemes még megemlíteni, hogy a DLC kötődése nemcsak az M11 és MV2 miozin fragmentumok látszólagos olvadáspontját (T_{mobs}), hanem az egyensúlyi (koncentráció független) T_m ($\Delta G = 0$) értékét is eltolja körülbelül $7\text{--}7 \text{ }^{\circ}\text{C}$ -al. A rövidebb, M3 fragmentum esetében a fehérjét dimerizálni képes *coiled-coil* régiók hiánya miatt a hődenaturációs kísérletben – elvárásainkkal megegyezően – nem volt látható kooperatív átmenet. Az M3 fragmentum ellipticitásának hőmérsékletfüggése széles, fokozatos hődenaturációt mutatott, ami alapján olvadáspontját (T_{mobs}) $20\text{--}25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra becsültük, de pontosan kiszámolni nem lehetett.

* Részletesen ld. „Megbeszélés és további célkitűzések” fejezet.

A DLC-nek a miozin-5a-ra gyakorolt szerkezetstabilizáló hatását limitált proteolízissel is megvizsgáltuk. A 22. ábra mutatja az M1 fragmentum tripszinnel történt limitált proteolízisét kétszeres mennyiségű DLC jelenlétében, illetve hiányában (a DLC – jól definiált stabil szerkezete révén – ellenáll a tripszines emésztésnek).

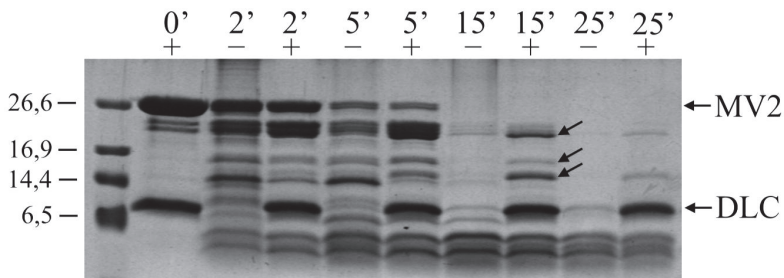


22. ábra: Az M1 fragmentum tripszinnel történt limitált proteolízise DLC mellett, illetve DLC nélkül. A ferde nyíllal jelölt miozin fragmentumot a DLC megvédte a proteolízistől. (Az ábra fölött a mintavétel ideje látható percben kifejezve, a jobb oldalán pedig a fehérjelétra méretei kDa-ban.)

A két gélképet összevetve szembetűnő, hogy a DLC kötődése hosszú távon megvédi az M1 fragmentum egy jól definiált szakaszát a proteolízistől, míg az M1 fragmentum önmagában elemésződik a tripszin által. A 22. ábra ferde nyíllal jelzett miozin fragmentumának N-terminálisa megegyezik az M1-ével, a mérete pedig (a létraként felvitt fehérjék méreteinek interpolálása alapján) ~16 kDa. Ebből az következik, hogy a DLC a kötőhelyétől távolabb eső hasítóhelyeket is megvédte a tripszines emésztéstől (a megmaradt fragmentum mérete alapján valószínűsíthetően egészen a disztális *coiled-coil*-ban található törésig, ld. 24. ábra), ami a disztális *coiled-coil* régióban történő szerkezetstabilizáló funkciót feltételez. Ennek a kísérletnek az eredményeképpen terveztük meg az M11 és M11ΔB konstrukciókat. Ezek N-terminálisa megegyezik az M1-gyel, viszont már nem tartalmazzák annak hasításra érzékeny C-terminális részét.

Ugyanezt a kísérletet elvégezve az MV2 fragmentummal (aminek a C-terminálisa megegyezik az M11-ével, viszont N-terminálisan a mediális *coiled-coil* régiót is tartalmazza) megállapítást nyert, hogy a DLC a Gly1198-as pozíciótól kezdődően védte meg az N-terminális régiót az emésztődéstől (nem közölt ábra). Ez azt jelenti, hogy a DLC kötődése nemcsak a miozin-5a disztális, hanem a mediális *coiled-coil* régióját is stabilizálja.

Proteináz-K enzimet használva hasonló eredményre jutunk: a DLC jelenlétében az MV2 fragmentum lassabban emésződik (23. ábra).



23. ábra: Az MV2 miozin-5a fragmentum proteolízise Proteináz-K-val DLC mellett (+), illetve DLC nélkül (-). A három ferde nyíl a DLC által megvédett miozin fragmentumokra mutat rá. (Az ábra fölött a mintavétel ideje látható percben kifejezve, a bal oldalon pedig a fehérjelétra méretei kDa-ban.)

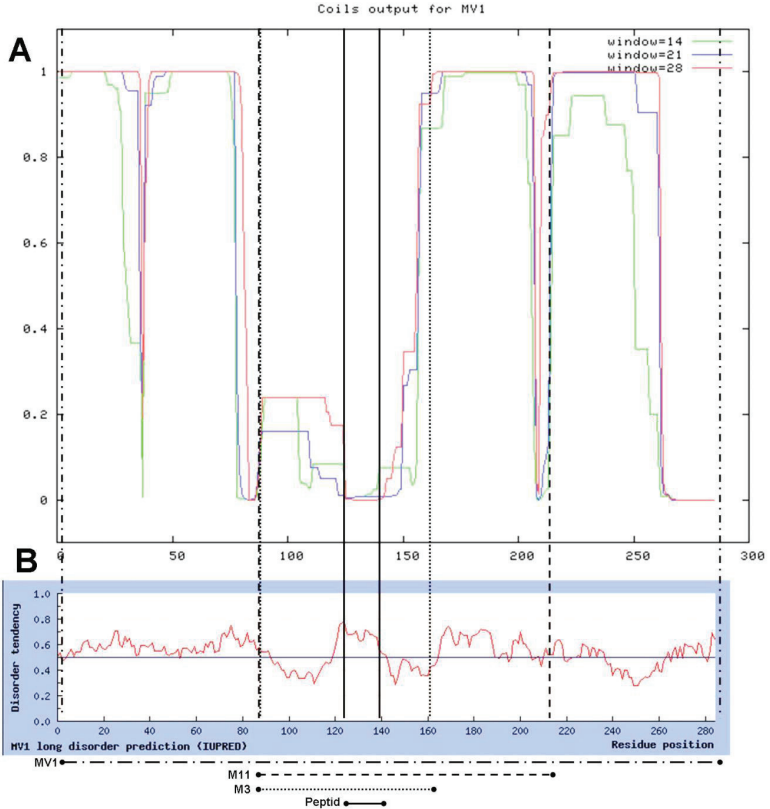
A három – ferde nyíllal jelölt – megmaradt fragmentum mérete (~14,5, ~16,5 és ~19,5 kDa) és N-terminális szekvenálása alapján úgy tűnik, hogy a DLC a következő hasítóhelyeket védte meg az emésztéstől: ~Ala1199, Val1274 és Leu1326. Ez azt jelenti, hogy a DLC – a miozin-5a-ra kifejtett szerkezetstabilizáló funkciója révén – a tripszinnél több helyen hasító proteináz K-val szemben is megvédte a miozin mediális és disztális *coiled-coil*-jait (24. ábra) a proteolízistől. Következtetésünk:

A DLC kötődése stabilizálja a miozin-5a farokrégiójában található *coiled-coil* doméneket.

7.1.5. A miozin-5a DLC-kötő régiójának szerkezeti jellemzése

Kötődés-vizsgálataink közben szinte minden mérés eredményének kiértékelésénél (sőt már a miozin fragmentumok, valamint a kísérletek tervezésénél is) figyelembe kellett vennünk a miozin-5a szerkezetében jelenlevő *coiled-coil* régiókat, illetve kötődés indukálta szerkezetváltozásokat. Miért is olyan fontos ez a kérdés esetünkben? A következő fejezetben ezt szeretném áttekinteni az általunk vizsgált egyik legnagyobb miozin-5a szakasz (MV1), és a benne foglalt rövidebb fragmentumok szerkezeti jellemzésén szemléltetve, *in silico* predikciók alapján.

A miozin-5a irodalomból ismert DLC-kötő régiója (1236-1420) jósolhatóan szegmentált *coiled-coil*. Ezért, hogy az expressziós nehézségeket minimálisra csökkentstük (valamint hogy a DLC kötődés miozinra gyakorolt szerkezeti hatásait is vizsgálni tudjuk), miozin konstrukcióinkat a farokrégió prediktált szerkezetét maximálisan figyelembe véve készítettük el.

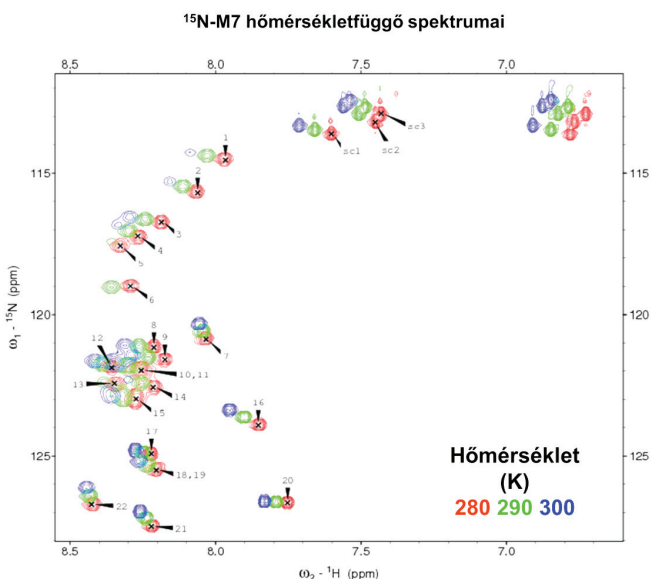


24. ábra: Szerkezet- és szerkezetnélküliség-jóslás. (A) az MV1 fragmentum coiled-coil régiói a COILS programmal analizálva (B) az MV1 fragmentum IUPred programmal szerkezetnélkülnek becsült régiói (a könnyebb áttekinthetőség kedvéért az ábra alatti szakaszokkal megegyező mintájú függőleges vonalakkal jelöltem néhány kisebb miozin konstrukció N- illetve C-terminálisát, illetve a DLC általunk azonosított (peptid) kötőhelyét).

Az MV1 miozin fragmentum szerkezet predikcióját a COILS (24. ábra) és PAIRCOIL (nem közölt ábra) programokkal végeztük. Az MV1 fragmentum N- és C-terminális része is *coiled-coil* dimert képez két, néhány aminosavból álló megszakítás kivételével. (N-terminálisan Glu-Glu-Glu, C-terminálisan Pro-Pro-Glu – e két töréspont közötti régiót védte meg a DLC a proteináz-K-val szemben, ld. előző oldal.) A miozin-5a fehérjén belül elhelyezve az MV1 régiót, az MV1 első *coiled-coil*-ja a miozin-5a mediális *coiled-coil*-jának fele meg, a második pedig a disztális *coiled-coil*-jának (8. ábra). Az M11 fragmentum csak a

disztális *coiled-coil* első felét tartalmazza (14. és 24. ábra), amely mint láttuk, csak kisebb stabilitású molekulát eredményez. Ennek a régiónak a stabilitását a DLC kötődése megnöveli.

A PHD szerverrel elvégzett másodlagos szerkezet predikció alapján az MV1 fragmentum nem *coiled-coil* középső harmada (M3 fragmentum) α -hélix szakaszokat tartalmaz, valamint egy hosszabb szerkezet nélküli régiót (kb. 10 aminosav), pontosan azon a szakaszon belül, ahová a DLC kötődik. Ezt a szerkezetnélküliséget *in silico* az IUPred (24. ábra), PONDR és GlobProt programokkal megerősítettük, valamint *in vitro* CD és NMR (25. ábra) méréseink is ezt támasztják alá. Feltételezzük, hogy ezt a régiót a DLC kötődése stabilizálja, és ennek hatására veheti fel a kötőpartnerekben eddig kimutatott β -lánc struktúráját.



25. ábra: ^{15}N -jelölt M7 HSQC spektrumai (különböző hőmérsékleteken mérve). A szűk spektrális tartomány viszonylag hasonló kémiai környezetre, azaz szerkezet nélküli régióra utal.

A miozin-5a rúdrégió DLC-vel alkotott komplexének pontos szerkezetét kristályosítás útján is megpróbáltuk meghatározni, Anne Houdusse laboratóriuma (Curie Intézet, Párizs) segítségével. Az MV2 – DLC komplex mellett készítettünk direkt kristályosítási célra két új miozin fragmentumot: az egyik a mediális *coiled-coil* töréspontjától a disztális *coiled-coil* töréspontjáig tart (MV4), a másik pedig az MV4-nek – a még nagyobb stabilitás érdekében – mindkét végén egy-egy folytatódagasan illeszkedő leucin cipzárral meghosszabbított változata

(MV3). Mivel a miozin-5a rúdregióját eddig csak elektronmikroszkópos felvételek alapján ismerjük, jelenleg is folyamatban van a fragmentumok és mindhárom komplex kristályosítása. A DLC-t egy rövidebb miozin peptiddel (IQPK~~DDK~~NTMTDST) Radnai László kollégám (Katona Gergely laboratóriumában, Göteborgi Egyetem, Svédország) sikeresen kristályosította (19. ábra). Következtetésünk:

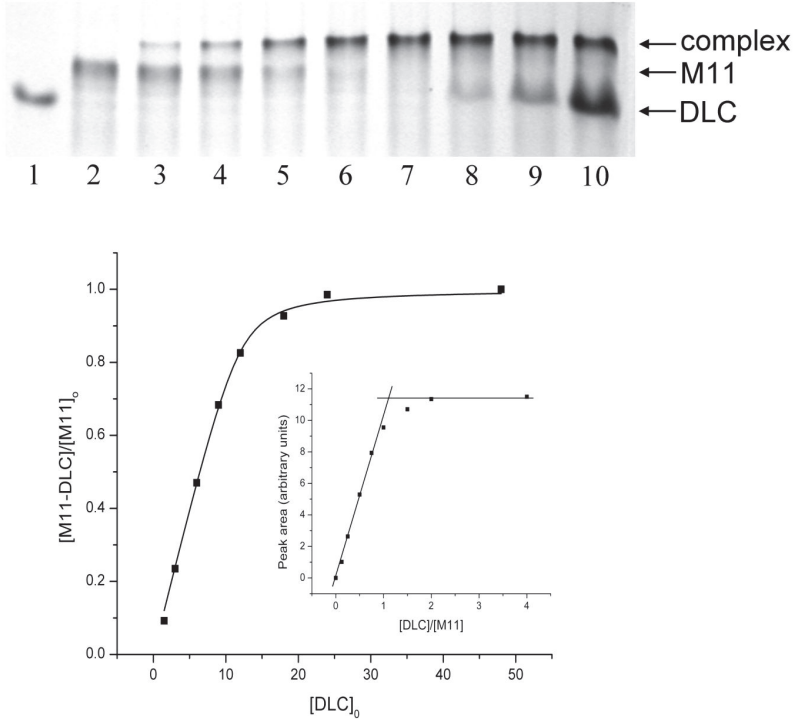
A miozin-5a DLC-kötő régiója a DLC kötődésének hiányában rendezetlen (*intrinsically disordered*) szerkezetű.

7.1.6. A DLC – miozin-5a komplex sztöchiometriája és a kötés erőssége

Mindkét vizsgált fehérjénk dimer szerkezetű, így komplexük fontos jellemzője a sztöchiometria. Eredményeink alapján a miozin-5a a DLC kötőárkába köt be, ami feltételezi a DLC dimer voltát, de mit tudunk a miozinról? A DLC dimer forgásszimmetrikus, és a DLC kötőhely a miozin-5a-n annak mediális és disztális *coiled-coil*-ja közti rendezetlen régiójában van. Mivel pontosabb szerkezeti információ nem állt rendelkezésünkre, kíváncsiak voltunk, hogy egy miozin dimerhez csak egy DLC dimer tud-e kötődni vagy akár kettő is. CD és NMR spektroszkópiás eredményeink a miozin-5a – DLC komplex 1:1 (azaz dimerek lévén 2:2) arányát támasztották alá, de mivel korábban felmerült a DLC kargóköti szerepe is, megvizsgáltuk, hogy lehet-e esetleg 1:2 (azaz 2:4) az arányuk, ha nagy feleslegben adunk DLC-t a rendszerhez. A sztöchiometria meghatározására szolgáló kísérletekből egyúttal a komplex kötéserősségét is meghatároztuk.

Először natív gélen futtattuk meg a DLC – miozin komplexet. Ebben a kísérletben az M11 dimer miozin fragmentumot növekvő mennyiségű DLC-vel titráltuk, majd gélre vittük (26. ábra/A). Látszik, hogy a miozin dimerhez még négyszeres DLC koncentráció esetén sem kötődik több DLC, mert egyrészt nem jelenik meg a gélen magasabban egy új sáv (ami a 2:4 arányú komplexnek felene meg), valamint a komplex denzitása sem nő tovább az M11-nél magasabb DLC koncentráció esetén (26. ábra, belső grafikon). A képződött komplex-mennyiség denzitometriás értékeit a DLC/M11 arányában ábrázolva, majd két külön egyenest illesztve azokra a pontokra, ahol a DLC, illetve a miozin volt feleslegben, a következő állapítható meg: a két egyenes metszéspontjának megfelelő DLC/M11 arány ~ 1 , tehát magasabb DLC koncentráció esetén sem kötődik egy miozin dimerhez több DLC dimer. A elektroforetogram komplex csíkjainak denzitometriás analiziséből nyert pontokra ezen kívül

tökéletesen ráfekszik az 1:1 kötődési arányt feltételező függvény is (26. ábra grafikon), amiből a számolt disszociációs konstans $\sim 0,4 \mu\text{M}$ az M11–DLC komplex esetében.

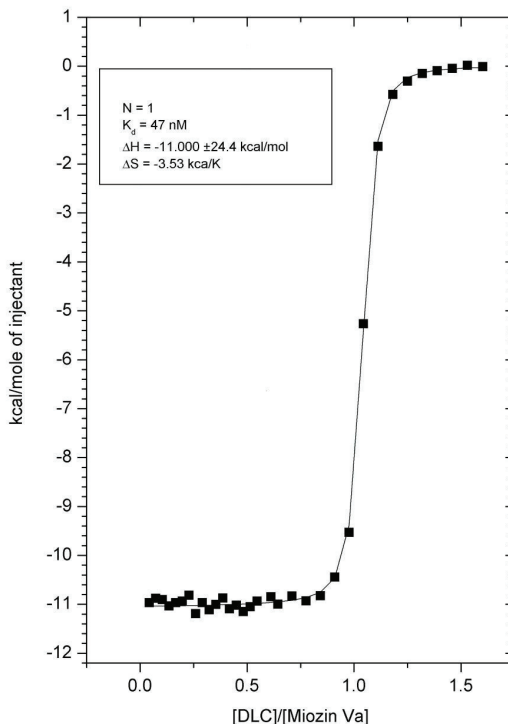


26. ábra: A DLC – M11 komplex sztöchiometriájának vizsgálata natív PAGE segítségével. A gélen az M11 fragmentum látható, növekvő koncentrációjú DLC-vel titrálva: az 1-es és 2-es minta a DLC, ill. az M11 önmagukban, majd a következő mólarányú keverékek (M11 : DLC) = 1:0,125; 1:0,25; 1:0,5; 1:0,75; 1:1; 1:1,5; 1:2; 1:4. Jól látszik, hogy a 7. oszlopban (1:1 aránynál) van jelen kizárólag a komplex csík, azaz nincs feleslegben egyik fehérje sem. A megjelenő komplex csíkok denzitometriás analíziséből készült grafikon alapján a $K_d \sim 0,4 \mu\text{M}$, és a sztöchiometria 2:2 (belső grafikon).

A kísérletet a stabilabb dimer MV2-vel és a monomer M3-mal is elvégezve (nem közölt ábrák) kimutattuk, hogy a miozin fragmentum hossza, illetve dimer/monomer volta nem befolyásolja a komplex sztöchiometriáját, azaz eredményünk valós érték.

Eredményeink megerősítésére az izotermális titrációs kalorimetriát választottuk (ITC). Ez a módszer azon alapszik, hogy egy temperált cellában levő fehérjét kis adagokban titrálva a kötőpartnerével a kötődési folyamat során mérhető az adott állandó hőmérséklet fenntartásához szükséges hozzáadott, vagy elvett hő (a kötés exoterm, vagy endoterm voltától

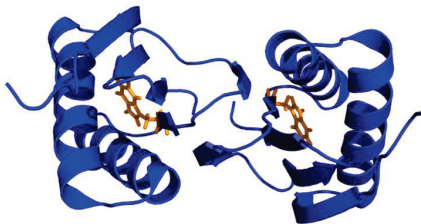
függően). A kalorimetriás mérésből kiszámolható a disszociációs konstans (K_d), a reakció sztöchiometriája (n) valamint az entalpia- (ΔH) és az entrópiaváltozás (ΔS).



27. ábra: Az MV2 miozin fragmentum és a DLC kötődésének termodinamikai paramétereit izotermális titrációs kalorimetriával meghatározva. (K_d = disszociációs konstans, n = a reakció sztöchiometriája, ΔH = entalpia- és ΔS = entrópiaváltozás).

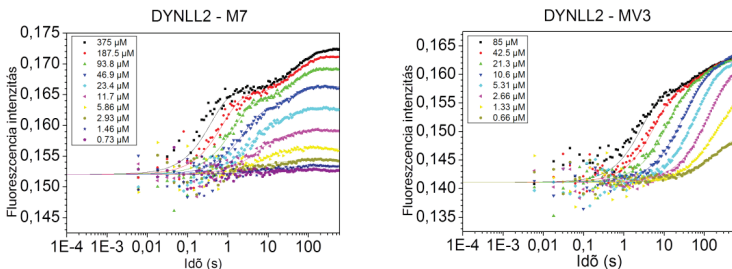
Kísérletünkben a cellában levő MV2-t titráltuk tömény DLC-vel. A hőmérséklet visszaállításához szükséges hőmennyiség integrált adataira az egy kötőhelyes modellel illesztettünk görbét (27. ábra), ami a DLC dimer kötőhelyeinek egymástól független működését feltételezi. (NMR-rel mérve pár aminosav esetében ugyan mutatkozott kismértékű kooperativitás a kötőhelyek között, azonban ITC-ben ez nem látszott, és mivel az egy kötőhelyes modell tökéletesen illeszkedett mérési pontjainkra, így nem volt indokolt bonyolultabb modell használata.) A miozin-5a és DLC aránya (n) ebben a kísérletben is 1:1 (azaz 2:2) lett, a K_d (disszociációs konstans) pedig 47 nM.

Fordított kísérletben a DLC-t titráltuk a miozin-5a peptiddel (PKDDKNTMTD). Itt szintén 1:1-nek adódott a sztöchiometria, viszont a peptid kötődése több nagyságrenddel gyengébbnek mutatkozott a hosszabb és dimer MV2-nél (nem közölt ábra). Kollégáim (Radnai *et al.*, 2010) később az M7 miozin peptid és a mindkét végén leucin cipzárt tartalmazó stabil dimer MV3 fragmentum között körülbelül 240-szeres kötőerősség-különbséget mértek.



28. ábra: A DLC-ben található 54-es triptofán elhelyezkedése.

Mivel a DLC-ben monomerenként egy triptofán található (28. ábra), a kötőerősséget fluorimetriával is megpróbáltuk kimérni. 295 nm-es gerjesztésnél 336 nm körüli az 54-es pozícióban levő triptofán emissziós maximuma, ami eltemetett, hidrofób környezetre utal, egybevágóan a molekula ismert térszerkezetével. A fluoreszcencia a DLC miozinhöz történő kötődésekor méréseink alapján megnőtt (nem közölt ábra), azaz megváltozott a triptofán kémiai környezete, így monitorozható volt a kötődés. A növekedés azonban időben nem volt egyenletes, azt követés titrálással nehéz volt kimérni, így felmerült a gyanúnk, hogy a DLC-ben több különböző folyamat is zajlik a miozin kötőárokba kötődésekor. Mégis ez az előkísérlet mutatta meg, hogy a fluorimetria alkalmas a DLC kötési kinetikájának vizsgálatára, amit Radnai László kollégám a későbbiekben megállított áramlásos (*stopped-flow*) fluoreszcens spektroszkópiával (29. ábra) meg is mért (Radnai *et al.*, 2010).



29. ábra: A DLC kötődésének vizsgálata megállított áramlásos (*stopped-flow*) fluoreszcens spektroszkópiával különböző koncentrációjú M7, illetve MV3 miozin fragmentumokhoz (Radnai *et al.*, 2010).

Megállapítottuk tehát, hogy a rövidebb miozin fragmentumok DLC komplexének magasabb a K_d -je. Mint korábban megfigyeltük (ld. cirkuláris dikroizmus), minél rövidebb (kisebb *coiled-coil* tartalmú, azaz kevésbé dimer) egy miozin-5a fragmentum, annál nagyobb a disszociációs konstansa saját magának is. Ezt a jelenséget, hogy dimer ligandumok esetén, bár a kötődés szimmetrikus (egymástól független), mégis kisebb a látszólagos disszociációs konstans a monomer formáénál, aviditásnak hívják (Mammen *et al.*, 1998), és először antitesteknél figyelték meg. Az aviditás jelenségének oka, hogy az egyik kötés megszűnése esetén a dimer forma folyományaként közel marad a ligandum, így nagyobb eséllyel kötődik vissza, tehát maga a dimer-dimer komplex lassabban disszociál. Emiatt a $K_d = k_{\text{off}} / k_{\text{on}}$ egyenletben a k_{off} csökken, tehát a K_d is. Ezt a sejtést a DLC esetében Rapali Péter és Radnai László kollégáim a későbbiek során – a sebességi állandók felszíni plazmon rezonancia (SPR) módszerrel történő megméréseivel – bizonyították is (Radnai *et al.*, 2010). Következtetésünk:

A komplexben a DLC – miozin-5a aránya 1:1 (2:2), tehát egy DLC dimer köt egy miozin dimerhez. A dimer miozin erősebben kötődik a DLC-hez, mint a csak a DLC kötőrégióját tartalmazó szintetikus peptid, amit az aviditás jelensége magyaráz.

7.2. Egyéb DLC kötőpartnerek

A miozin-5a DLC kötésének feltérképezése után néhány egyéb DLC kötőpartnerrel is végeztünk vizsgálatokat. Olyan – nagyrészt élesztő-két-hibrid rendszerben kimutatott – kötőpartner fehérjéket válsztottuk, amelyek nem tartalmaznak konszenzus DLC kötőhelyet (IkBa, PKI α , Pak1), illetve több lehetséges kötőhelyet is tartalmaznak (ATMIN).

Közülük 3 fehérjével történt kötővizsgálati eredményeinket a 4. táblázat foglalja össze, míg a Pak1-ről a következő fejezet szól.

4. táblázat: Az IkBa, PKI α és ATMIN fehérjék DLC kötővizsgálatainak összefoglalója (+ kötődést mutat, – kötődést nem mutat)

Kötési assay						
Fehérje	Kiindulási kötőrégió ⁱ (aminosav)	Gélszűrés	„Pull-down”	CD spektroszkópia	Élesztő-két-hibrid rendszer*	Konklúzió
IkBa	1-100	–		–	–	Nem köt (+: Crépieux <i>et al.</i> , 1997)
PKI α	1-72	–	–	–	–	Nem köt (+: Yu <i>et al.</i> , 2002)
ATMIN	362-823				362-572	Minimum két kötőhely található a kiindulási szekvenciában
					+	
					572-823	
					+	

* Az élesztő-két-hibrid módszer leírása a következő fejezetben található

ⁱ: irodalmi adatok alapján kötődés várható

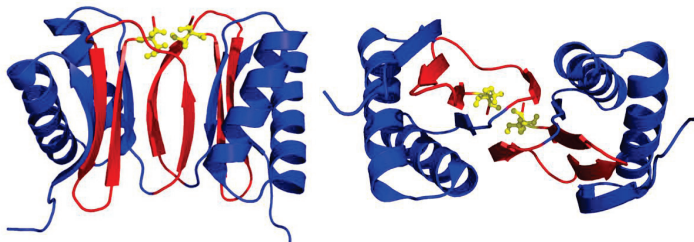
Következtetésünk:

Az ATMIN fehérjén belül több DLC kötőhely is található, az IkBa és a PKA inhibitor DLC-hez történő, irodalomban leírt kötődését viszont több módszerrel sem tudtuk megerősíteni.

7.3. Pak1 kináz általi foszforiláció hatása a DLC-re

7.3.1. A DLC (Ser88) foszforilációja

2004-ben Vadlamudi és mtsi. leírták, hogy a Pak1 (p21-aktivált kináz) nem csak hogy köti, hanem foszforilálja is a DLC1-et, annak 88-as Ser oldalán. A miozin-5a-hoz hasonlóan a Pak1-ben sem található konszenzus DLC-kötő motívum, de mivel a Pak1 foszforilálja is a DLC-t, ismét felmerült a gyanú a többi fehérjétől eltérő kötési módra, ami a foszforiláció esetleges szabályozó funkcióját is megerősítené. Ezt a sejtést támasztotta alá, hogy a Vadlamudi és kollégái által végzett *in vitro* „pull-down” assay-ben a Pak1 a DLC C-terminális – mindössze 20 aminosavas – szakaszát (GST-DLC 70-89) is kötötte és foszforilálta (30. ábra, függelék III./C. ábra). Ez a szakasz pedig a dimerizációs felszín hiányában monomer peptid kell hogy legyen, míg eddig a DLC összes leírt kötőpartnere a dimerizáció során létrejött árokba kötődött.

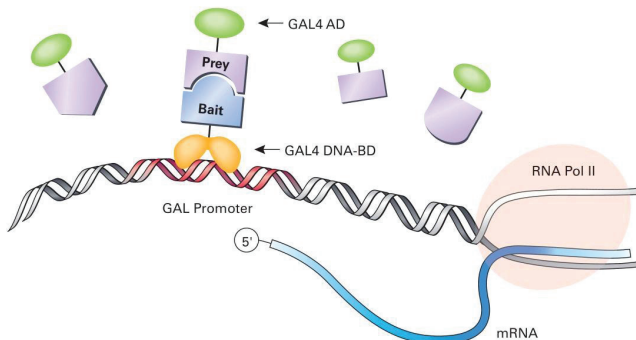


30. ábra: A DLC S88-as foszforilációs helye (sárgával) kiemelve a Vadlamudi és mtsi. (2004.) szerinti Pak1 által kötött DLC régió (piros) belül.

7.3.2. A Pak1 kináz DLC kötőhelyének azonosítása

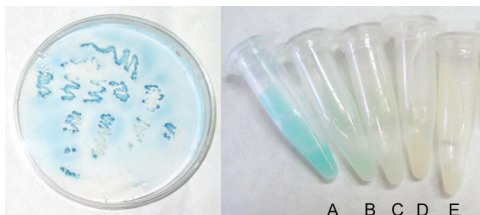
Vizsgálataink a Pak1 esetében is a fehérje DLC kötőhelyének feltérképezésével kezdődtek. Ismert volt, hogy élesztő-két-hibrid rendszerben a DLC1 a Pak1 203-270 aminosavai közé kötődött (Vadlamudi *et al.*, 2004), a DLC2 pedig a Pak1 210-332 közé (Lu *et al.*, 2005).

A kötőhely azonosításához mi is az élesztő-két-hibrid rendszert választottuk – és átfedő fragmentumokra vágva a Pak1-nek ezt a 204-273-ig tartó szakaszát – elkészítettük konstrukcióinkat. A DLC1-et használtuk csalinak, amit a GAL4 DNS-kötő domént (DNA-BD) tartalmazó pGBT9 vektorba klónoztunk be, míg a vizsgálni kívánt fehérjéket a GAL4 aktivációs domént (DNA-AD) tartalmazó pGAD vektorba tettük (31. ábra).



31. ábra: A két vizsgált fehérje (csali és próba) kötődése esetén a GAL4 DNS-kötő és aktivációs alegysége közel kerül egymáshoz és a GAL promoterhez, így az RNS polimeráz II át tudja írni a riporter gén(ek)e)t (Yeast Two-Hybrid Systems Brochure, Clontech).

A két vizsgált fehérje kötődését két méréssel is igazoltuk. Az egyik riporter génnek (HIS3) köszönhetően hisztidin-mentes táptalajon is nőtt az élesztő, illetve a másik riporter gén (lacZ) átíródása esetén az α -galaktozidáz teszt kék telepeket eredményezett (32. ábra).



32. ábra: A lacZ riporter gén megjelenésének vizsgálata α -galaktozidáz aktivitás méréssel, petricsészében nitrocellulóz membránon, illetve mikrocentrifuga csőben végezve. A mikrocentrifuga csővekben a 33. ábra szerinti Pak1 fragmentumok láthatóak DLC-vel kotranszjektálva. A kék szín a két vizsgált fehérje kötődése esetén jelenik meg.

A Pak1 DLC-kötő régióját a 204-229 aminosavak közé sikerült leszűkítenünk (33. ábra). A fragmentumok méretének csökkenésével láthatóan csökken a jelerősség is, aminek oka feltehetően az, hogy a DLC gyengébben kötődik a rövidebb Pak1 fragmentumokhoz, amint azt már más DLC kötőpartnerek esetében is megfigyeltük.

In vitro:			
Y2H:			
A- pak1 204-281	SVIEPLPVTPTRDVTSPISPTENNTTPPDALTRNTEKQKKKPKMSDEEILEKLRSIVSGDPKK	Kötés:	+
B- pak1 204-242	SVIEPLPVTPTRDVTSPISPTENNTTPPDALTRNTEKQKKKPKMSDEEILEKLRSIVSGDPKKKYTRFEKIQGAS		+++
C- pak1 204-229	SVIEPLPVTPTRDVTSPISPTENNTTPPDALTRNTEK		++
D- pak1 220-260	SVIEPLPVTPTRDVTSPISPTENNTTPPDALTRNTEKQKKKPKMSDEEILEKLRSI		+
E- pak1 249-281	SPISPTENNTTPPDALTRNTEKQKKKPKMSDEEILEKLRSI		-

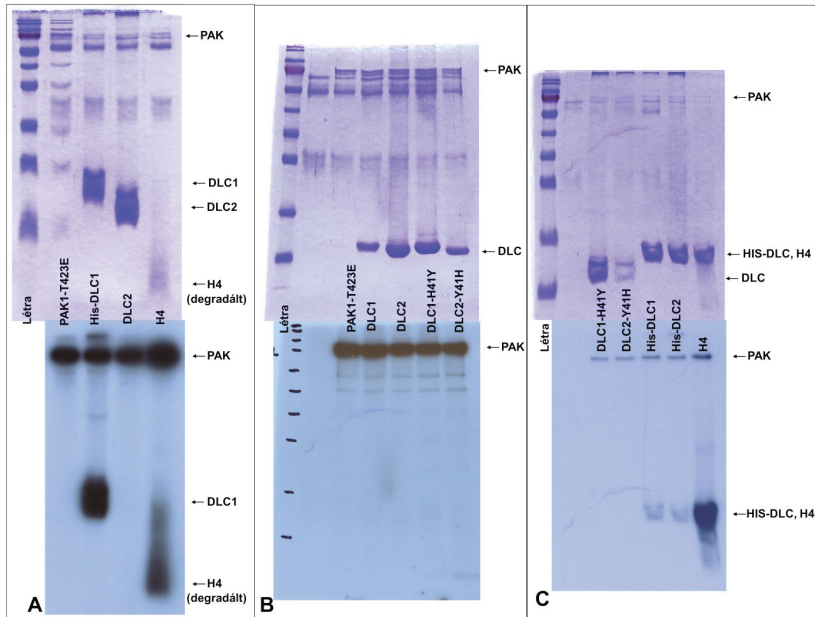
33. ábra: Különböző Pak1 fragmentumok DLC-hez való kötődése élesztő-két-hibrid rendszerben

A kiindulási (Pak1 204-273) fragmentummal komplexben lévő ^{15}N -jelölt DLC NMR méréseink alapján a Pak1 – a többi kötőpartnerrel megegyzően – a DLC kötőárákába köt (nem közölt ábra). Következtetésünk:

A Pak1 kináz a 204-229 régióban található motívummal kötődik a DLC kötőárákába.

7.3.3. A DLC Pak1 általi foszforilációja

Miután a Pak1 DLC kötőhelyét meghatároztuk, további kísérleteinkhez a foszforilációt mimikáló DLC-S88E mutáns (ld. később) mellett szükségünk volt valódi foszforilált DLC-re is. A rekombinánsan előállított DLC-t emlős sejt kultúrából izolált Pak1-gyel (autoaktivált T423E mutáns) foszforiláltuk, majd a foszforiláció sikerességét kináz teszttel ellenőriztük le.*



34. ábra: Különböző DLC konstrukciók Pak1-gyel történt foszforilációs kísérletei (kináz aktivitás mérés). Az A, B és C ábrák időben egymást követik, felül a gélképek, alattuk a hozzájuk tartozó autoradiogramok láthatóak. Az ábrákhoz tartozó részletes magyarázat a szövegben található.

* A kináz assay-t Dr. Buday László végezte.

Bár a DLC1 és DLC2 *in vitro* azonosan viselkedik, emlősejtben *in vivo* kimutattak közöttük különbségeket (Day *et al.*, 2004). Ezért, mivel a DLC Pak1 általi foszforilációja mögött szabályozási folyamatot sejtettünk, mindkét DLC paralóggal elvégeztük a foszforilációs mérést. Nagy meglepetésünkre a Pak1 csak a DLC1-et foszforilálta, a DLC2-t nem (34. ábra/A. kép).

Mi lehet ennek a magyarázata? A DLC paralógok 6 eltérő aminosava közül korábban csak a 41-es pozícióban levő hisztidint, illetve triptofánt találták felelősnek kötődésbeli különbségért *in vivo* (Day *et al.*, 2004), így a DLC1 és DLC2 közti különbség kiderítésére első körben pontmutációval létrehozott két új konstrukciónak a DLC1-H41Y-t és a DLC2-Y41H-t választottuk. Ezekkel megismételve a kináz *assay*-t (valamint hogy áttekinthető legyen a gélfuttatás képe, közben a DLC1-ről is levágtuk a His-címkét), ismét meglepő eredményt kaptunk. Amint a 34. ábra B része mutatja, a Pak1 ebben a kísérletben egyik DLC-t sem foszforilálta! (Önmagát viszont igen, tehát a teszt jól működött.) A két film alapján (34. ábra A és B kép) felmerült a gyanúnk, hogy a Pak1 valójában nem is a DLC-t, hanem csak a rajta levő His-címkét foszforilálta. Harmadszorra is megismételtük a kísérletet, ezúttal His-DLC1-et és His-DLC2-t foszforiláltattunk, a két új mutáns DLC-t használva kontrollnak. Sejtésünk beigazolódott (34. ábra/C. kép): a Pak1 kizárólag a His-címkés DLC-ket foszforilálta.

A számunkra kiindulásul szolgáló kísérletben Vadlamudi és társai GST- (néhány esetben „TAT basic” szekvencia) fúziós címkét tartalmazó DLC-t foszforiláltak, így a foszforiláció feltehetőleg nem magán a címkén, hanem az összes vizsgált fúziós fehérjében jelen levő trombin hasítóhelyen történt. Ezt a feltételezést Lightcap és mtsi. 2008-ban szintén kináz *assay*-vel megerősítették, valamint leírták, hogy a Pak1 DLC-hez való kötődésekor a Ser88-hoz sztérikusan nem férhet hozzá a kináz domain. Azonban nyitva maradt a kérdés, hogy címkét tartalmazó fehérjék negatív kináz mérés eredményeit hogyan kaphatták Vadlamudi és társai a GST-DLC1-87 (függelék III./ E. ábra) és az DLC1-S88A (függelék III./ F. ábra) esetében. Következtetésünk:

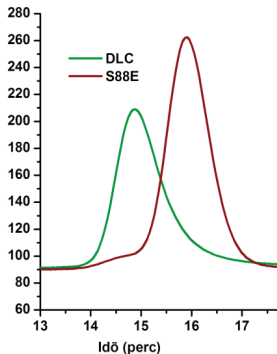
Nem a Pak1 kináz foszforilálja a DLC-t a Ser88 pozícióban.

7.3.4. A Ser88 foszforiláció hatása a DLC-re

A DLC-t tehát nem a Pak1 foszforilálja. Ezért a foszforiláció hatására vonatkozó méréseinket – a megfelelő kináz ismeretének hiányában – egyrészt a foszforilációt mimikáló, és az irodalomban elfogadott szerin-glutaminsav cserével (DLC-S88E; „molekuláris

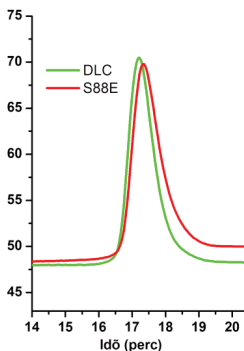
mimikri”), másrészt – az irodalmi adatok alapján a foszforilált DLC-hez hasonlóan viselkedő – DLC 1-87 mutánsnal (DLC-Δ2, Vadlamudi *et al.*, 2004, Song *et al.*, 2007) végeztük.

Vad típusú és a foszforilált DLC-t összehasonlító méréseinket gélszűrőssel kezdtük. Natív körülmények között a DLC-S88E kisebbnek mutatkozott a vad típusnál (35. ábra).



35. ábra: A DLC és DLC-S88E gélszűrése natív körülmények között (pH 7,6). A DLC az S88E mutánsnál hamarabb jön le az oszlopról, a kalibrációs alapján (nem közölt ábra) kétszeres méretbeli különbség van köztük. Belső kontrollnak a később azonos időben megjelenő Na-azid csúcsokat használtuk.

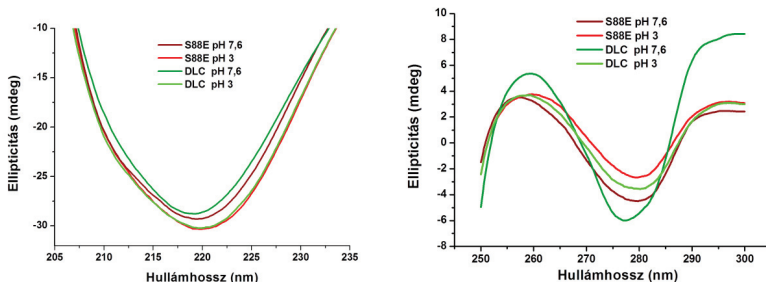
Mivel irodalmi adatok alapján ismert volt, hogy a DLC savas közegben monomerekre esik szét, és pH 3-on már csak a monomer forma fordul elő (Wang *et al.*, 2003; Makokha *et al.*, 2004), feltevésünk igazolására citrát pufferben megismételtük a gélszűrést (36. ábra). Látható, hogy az S88E mutáns savas közegben valóban megegyező méretűnek mutatkozik a monomer vad típusúval.



36. ábra: A DLC és DLC-S88E gélszűrése citrát pufferben (pH 3). A vizsgált fehérjéink savas közegben azonos idő alatt jönnek le az oszlopról. A csúcsok (időbeli) jobbra tolódását az okozza, hogy a két csúcs átfedésének precízebb bizonyítása érdekében harmadával lecsökkentettük az áramlási sebességet (0,5 ml/percre). A később megjelenő Na-azid csúcsok itt is átfednek.

A méretbeli különbséget natív PAGE módszerrel is megerősítettük (nem közölt ábra). Ez utóbbi kísérleteknél a szintén monomer DLC- $\Delta 2$ mutánt használtuk az S88E helyett, hogy csak méret szerint váljanak el a DLC-k, és az extra töltés (Glu) ne befolyásoljon.

Ezután cirkuláris dikroizmus spektroszkópiával felvettük a DLC-k közeli és távoli spektrumait, a szerkezetbeli különbségek láthatóvá tétele céljából. A CD mérésrel egyúttal megerősítettük azt is, hogy a DLC- $\Delta 2$ szerkezete megegyezik a DLC-S88E-vel (nem közölt ábra), azaz jogosan használjuk annak helyettesítésére.

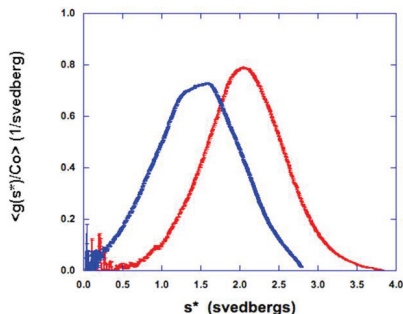


37. ábra: A DLC és DLC-S88E cirkuláris dikroizmus spektrumai távoli, illetve közeli UV tartományban natív és savas közegben felvéve. A távoli UV-ban felvett spektrumok nagyon hasonlóak, eltérést csak a közeli UV mutat a DLC pH 7,6 esetében. Magyarázat a szövegben.

A távoli UV-ban felvett spektrumok nagyon hasonlóak (37. ábra, első kép), tehát a savas pH a másodlagos szerkezetet nem változtatja meg, így a gél-sűrítés méretbeli különbsége valóban a dimer-monomer átalakulásból adódik. (Az egyetlen különbség a dimer DLC vállának a hiánya 211 nm körül.) Közele UV-ban – ami az aromás aminosavak környezetéről szolgáltat információt – azonban szembevető a vad típusú DLC savas pH hatására történő szerkezetváltozása (37. ábra, második kép), míg az S88E esetén nincs számottevő különbség a spektrumok között.

A dimer-monomer átmenet igazolására analitikai ultracentrifugálást is alkalmaztunk*. Ez a módszer a centrifugálás közbeni szedimentációs koefficiensből következtet a fehérje méretére, UV detektálás mellett.

* Az analitikai ultracentrifugálást Walter Stafford végezte (Boston Biomedical Research Institute).



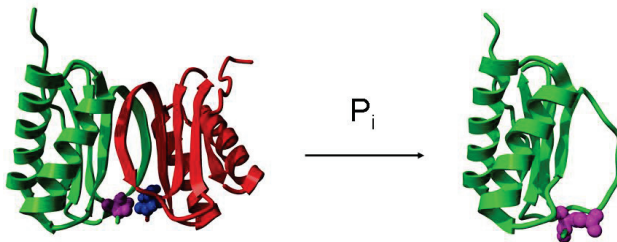
38. ábra: A DLC (piros) és DLC-S88E (kék) analitikai ultracentrifugálással mért szedimentációs spektrumai.

A vad típusú DLC mérete 23,1 kDa-nak (38. ábra, piros görbe és 5. táblázat), míg a DLC-S88E 10,4 kDa-nak adódott (38. ábra, kék görbe és 5. táblázat). Így arányuk $23,1 : 10,4 = 2,22$ ami egyértelműen bizonyítja, hogy a vad típusú DLC dimer, míg az S88E mutáns monomer.

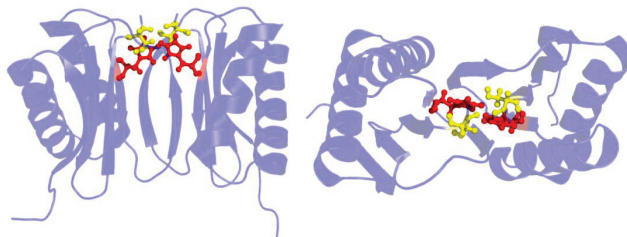
5. táblázat: A DLC és DLC-S88E analitikai ultracentrifugálással kapott eredményeinek kiértékelése F-próbával. A vad típusú DLC mérete 23,1 kDa (22,6 - 23,5, 95%-os valószínűséggel), a DLC-S88E 10,4 kDa (10,3 – 10,5, 95%-os valószínűséggel).

Legjobban illeszkedő értékek 95%-os konfidenciánál		
	Molekulatömeg (g/mol)	Szedimentációs koefficiens (S)
DLC2	$2,26 \times 10^4 < 2,31 \times 10^4 < 2,35 \times 10^4$	$2,124 < 2,129 < 2,133$
DLC2-S88E	$1,03 \times 10^4 < 1,04 \times 10^4 < 1,05 \times 10^4$	$1,596 < 1,598 < 1,601$

A foszforilált DLC-t mimikáló S88E mutánnal végzett kísérleteink alapján tehát kijelenthetjük, hogy a foszforiláció hatására a natív körülmények között dimer DLC monomerjeire disszociál (39. ábra). E disszociáció hasonló a savas közeg hatására bekövetkező disszociációhoz, aminek két – térben közeli – hisztidin protonálódása az oka.



39. ábra: A DLC dimer a foszforiláció hatására monomerjeire esik szét (Molnár Tamás ábrája)



40. ábra: A Ser88 (sárga) és a His55 (piros) térbeli elhelyezkedése a DLC dimerben.

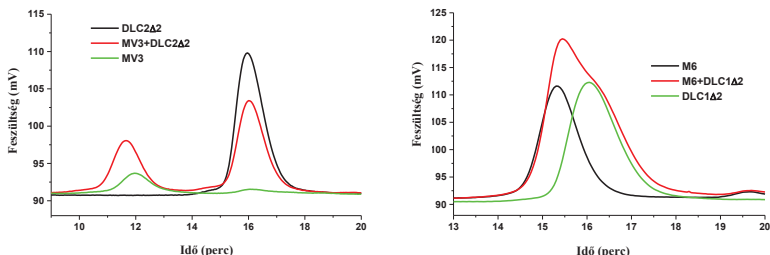
Mivel a foszforilálódó szerin oldalláncok szintén egymáshoz közel helyezkednek el (40. ábra), hasonló mechanizmust feltételezhetünk ebben az esetben is. Következtetésünk:

A Ser88 foszforiláció hatására a DLC monomer - dimer egyensúlya eltolódik a monomer állapot felé.

7.3.5. A foszforilált DLC miozin-5a kötése

A DLC foszforilációja tehát monomerizációhoz vezet. Kérdés, hogy mivel kötőpartnerei (vizsgálataink alapján a Pak1-et is beleértve) a dimerizáció során mindkét alegység közreműködésével létrejövő kötőárokba kötnek, a foszforilációval a DLC elveszti-e partnerei iránti kötőképeségét.

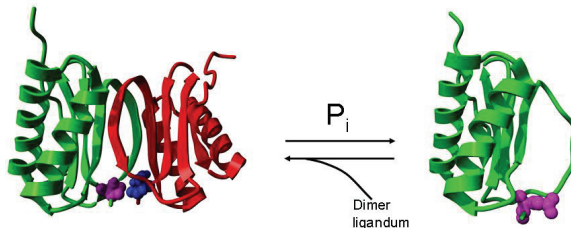
Vizsgálatainkat ezúttal is gélszűrőssel kezdtük, egy dimer (MV3) és egy monomer (M6) miozin fragmentumot választva lehetséges kötőpartnerként a DLC 1-87 monomer mutánsok (DLC1-Δ2 és DLC2-Δ2) számára. Eredményeink alapján a monomer DLC a monomer miozinhoz nem kötődött, viszont a dimerhez igen (41. ábra).



41. ábra: Egy dimer (MV3, egy N- és C-terminálisan is leucin cipzárat tartalmazó stabilan dimer miozin konstrukció) és egy monomer (M6) miozin fragmentum gélszűrése monomer DLC-vel (DLC1-Δ2 és DLC2-Δ2).

A kötési tesztet natív gélen is elvégezve ugyanerre az eredményre jutottunk: a DLC2Δ2 az MV3-hoz kötődött, míg az M6-hoz nem (nem közölt ábra).

Tehát a dimer kötőpartner képes eltolni a foszforilált DLC monomer-dimer egyensúlyát a dimer irányába*, és így a foszforiláció ellenére kötődni hozzá. Ez lényeges különbség, mert bár a DLC legtöbb kötőpartnere dimer, akad köztük néhány monomer is (aktivált Pak1, Bim/Bmf), így a foszforiláció diszkriminálni tud közöttük. Ez az első kimutatott szabályozó mechanizmus a DLC és kötőpartnerei között (42. ábra).



42. ábra: A foszforilált, és ezért monomer állapotú DLC-t a dimer ligandumok kötődése a dimerizáció irányába tolja (Molnár Tamás ábrája).

Rapali Péter és Radnai László kollégáim a későbbiekben fluoreszcencia anizotrópiával és felszíni plazmon-rezonancia vizsgálatokkal kimérték a pontos kötési állandókat, többféle monomer-dimer ligandum esetében – monomer, illetve dimer – DLC-hez való kötődésükkor (Radnai *et al.*, 2010). Eredményeik alátámasztják fenti méréseinket. Amennyiben csak az egyik kötőpartner monomer, úgy 50-250-szeresére növekszik a K_d a dimer-dimer állapothoz képest, amennyiben azonban mindkét kötőpartner monomer állapotú (például a DLC-S88E és a Bmf esetében), a K_d ismét majdnem újabb két nagyságrenddel nő (a dimer DLC-monomer Bmf-hez képest). Tehát a foszforilált DLC diszkriminálni tud kötőpartnerei között, és ezért nem mutatott a gélzűrési kísérletben kötődést az M6 a monomer DLC-hez. Következtetésünk:

A DLC dimer (erős) kötőpartnerei tudnak kötődni a foszforilált DLC-hez is.

* Ld. még: aviditás „A DLC – miozin-5a komplex sztöchiometriája és a kötési erőssége” fejezetben.

8. Megbeszélés és további célkitűzések

8.1. A miozin-5a rúd pontosított szerkezete

A miozin-5a-ból egyre rövidebb fehérje-konstrukciókat létrehozva gélszűréssel és *in vitro* „pull-down” assay-vel lokalizáltuk a DLC kötőhelyét a miozin-5a rúdrégiójában, az Ile1280 és az Ile1294 aminosavak között. Ez a szakasz a mediális és disztális *coiled-coil*-ok közötti – eddig nem ismert funkciójú – nem *coiled-coil* szerkezetű peptidszakaszon belül található a miozinban.

Felfedeztük a kötőhelyen belül található – mindössze 3 aminosav hosszúságú és korábban ismeretlen funkciójú – alternatívan kifejeződő B exon szerepét. Eredményeink szerint kifejeződése nélkülözhetetlen a DLC miozinhoz való kötődéséhez. Esszenciális szerepét *in vitro* „pull-down” assay-vel mutattuk ki, majd CD spektroszkópiával, gélszűréssel és *in vivo* kolokalizációval is megerősítettük. Eredményeinket egy amerikai kutatócsoporttal szinte egyszerre publikáltuk (Wagner et al., 2006)

A DLC miozin kötőhelyét is feltérképeztük. Kimutattuk, hogy a miozin-5a a DLC kötőárkába kötődik, ugyanoda, ahova a többi – konszenzus DLC kötőszekvenciát tartalmazó – fehérje. Ez az eredmény csökkentette a DLC feltételezett kargóköti szerepének valószínűségét, tekintve, hogy a DLC egy másik kötőpartnere (nNOS) kísérletünkben leszorította a DLC-t a miozinról. A kötőárkba való kötődést NMR spektroszkópiával és *in silico* dokkolással is alátámasztottuk, végül Radnai László kollégám a komplex kristályszerkezetét is meghatározta.

Natív PAGE és ITC kísérletekkel megállapítottuk, hogy a miozin-5a – DLC komplex sztöchiometriája 1:1 (2:2), azaz egy miozin dimerhez egy DLC dimer kötődik. Ez az eredmény tovább csökkenti a DLC esetleges kargóköti szerepének valószínűségét, mert – ha csak a térszerkezet nem akadályozza meg – kargókötés esetén két DLC dimer kötődne egy miozin dimerhez.

Kezdeti ITC eredményeinkből már látszott, hogy a hosszabb – és dimer szerkezetű – miozin fragmentumok több nagyságrenddel erősebben kötődnek a DLC-hez, mint a peptid méretűek (a különbség későbbi mérés alapján ~200 szoros, Radnai *et al.*, 2010). Ennek többféle oka is lehet: egyrészt a kooperativitás, másrészt a két fehérje közti – a kötőárkonkötőpeptiden kívüli – kölcsönhatás, harmadrészt az aviditás. Kooperativitást csak NMR méréseink során láttunk; ott is csak néhány, a kötőárkoktól távol eső aminosav mutatott csekély eltolódást. ITC-ben, illetve kollégáim kinetikai mérései során kooperativitás nem volt

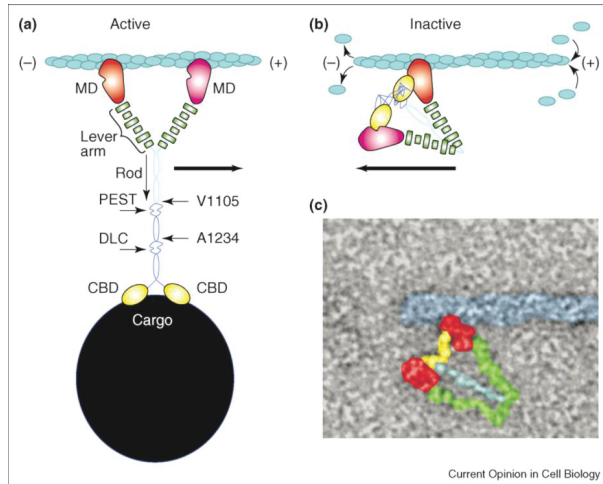
kimutatható. A kötőárkon-kötőpeptiden kívüli kölcsönhatással magyarázzuk a hosszabb, de még mindig peptid mérettartományú miozin-5a erősebb DLC kötését. Valamint a kristályosított komplexben látható peptid visszahajlásának is oka lehet egy kötőárok széli kölcsönhatás. Az aviditás – lényegéből adódóan – csak a hosszabb, dimerizálódni képes miozin fragmentumok (bivalens ligandumok) esetén játszik szerepet, a peptideknél nem, és ezt a tényt messzemenően alátámasztották a későbbi vizsgálataink (lecsökkenti a k_{off} -ot, emiatt lecsökken a K_d is, Radnai *et al.*, 2010). Így elsősorban ezt tartjuk felelősnek a kötéserősség jelentős növekedéséért hosszabb fragmentumok esetében.

Mindezek alapján valószínűsítjük, hogy a DLC – kargó adapterként – nem játszik szerepet a szállításban. A három eredmény amivel ezt alátámasztottuk: egyfelől a miozin-5a is a konszenzus DLC kötőhelyre köt, másfelől a miozin-5a – DLC komplex sztöchiometriája 1:1 (2:2), harmadrészt a DLC dimer a miozin dimer mindkét láncához kötődik. Újabb kutatások alapján a DLC résztvesz a dinein komplex összeszerelődésében a másik két dinein könnyű láncal együtt, és ezen keresztül közvetve végül is hatással van a kargókötésre (Nyarko *et al.*, 2004; Benison *et al.*, 2006). Amennyiben azonban egy motorfehérjéhez és egy, vagy több kargóhoz kapcsolódva is kimutatható a DLC jelenléte egy mintában, ott valószínűleg a DLC kötőpartnernek kapcsolódnak közvetlenül, vagy egyéb fehérjéken keresztül egymáshoz (pl.: DLC-Egl-BicD-DIC-DLC komplex, Dienstbier *et al.*, 2009); a DLC pedig mindkét fehérje esetében egymástól független stabilizáló funkciót tölt be. (A példaként említett komplexben jelen levő DIC az úgynevezett poli-bivalens állványzat- (*scaffold*) fehérjék csoportjába tartozik (Buday and Tompa, 2010). Ezek a fehérjék nagyobb komplexek részei, és jellemzően rendezetlen régiókat is tartalmaznak. A rendezetlen régióikhoz kötődő fehérjék (pl.: DLC) stabilizálják az állványzat-fehérjék szerkezetét, így alakítva ki azt a térszerkezetet, amelyhez már a többi kötőpartnerük is kötődni tud.)

A DLC szerkezetstabilizáló (dimerizáló) hatását a miozin-5a esetében CD spektroszkópiával és limitált proteolízissel mutattuk ki. Eredményeink szerint a DLC kötődése a miozin rúd mediális és a disztális *coiled-coil* régióit is stabilizálja. A dimer (*coiled-coil* tartalmú) miozin fragmentumok a DLC kötődésének hatására magasabb hőmérsékleten veszítették el natív szerkezetüket, és proteolitikus enzimekkel szemben is stabilabbnak bizonyultak az apo formánál. Ennek hátterében az lehet, hogy a dimer DLC a miozin mindkét láncához egyaránt kötődve – mintegy „molekuláris ragasztóként” – összetartja annak szerkezetét. A DLC kötődés stabilizáló hatása valószínűleg nemcsak a miozinra (és a korábban vizsgált Swallow-ra és DIC-re) igaz, hanem a többi DLC

kötőpartnerre is, hiszen többségükben egy *coiled-coil* közeli rendezetlen régióhoz kötődik a DLC.

A miozin-5a-ról időközben kiderült, hogy képes farokdoménjét (GTD) a fejéhez hajtva blokkolni saját ATP-áz aktivitását, ezáltal inaktív állapotba kerülni (Krementsov *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008).



43. ábra: A miozin-5a aktív és inaktív állapota (Taylor 2007).

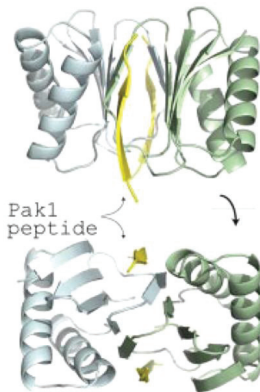
Krementsov és mtsi. szerint ehhez az állapothoz nem szükséges a DLC jelenléte; kísérleteikben DLC jelenlétében és hiányában is tapasztalták a visszahajlást (43. ábra/b). Megjegyzendő, hogy ők nem az agyspecifikus – azaz B exont is tartalmazó – miozin használták, így méréseik csak azt bizonyítják, hogy a DLC jelenléte nem szükséges az inaktív állapot létrejöttéhez – azaz hogy a DLC nem a szár-régió két részének „összeragasztásával” járul hozzá a miozin „félbehajtott” inaktív szerkezetéhez. Előfordulhat azonban, hogy éppen a DLC kötődés hiányában kissé destabilizálódott *coiled-coil* régiók segíthetik elő a farokdomén visszahajlását. Érdemes lenne megvizsgálni, hogy szabad DLC jelenléte megakadályozza-e (vagy éppenséggel elősegíti) az inaktív állapot létrejöttét B exont is tartalmazó miozin-5a esetén, illetve hogy DLC hozzáadásával újra aktív állapotba kerül-e az inaktív miozin-5a.

Mivel a DLC-nek sok egyéb kötőpartnere is ismert, amelyekhez különböző erősséggel kötődik, a lokális DLC koncentráció „finomhangolható”. Esetleg a miozin esetében is kötőplatform-kialakító szerep jut a DLC-nek, és a nehézlánc stabilizálásával a farokrészhez kötődő „valós kargó adapterek” kötőhelye így alakul ki (Morgan *et al.*, 2011).

További közvetett bizonyíték lehet a kötőplatform funkcióra, hogy találtak egy újabb Rab adaptert (Rab10, Roland *et al.*, 2009) – tovább növelve a miozin-5a farokrégiójához kötődő, a membránzállításban szerepet játszó Rab fehérjék számát. Az újonnan felfedezett Rab10 a *coiled-coil* rúdrégió B exontól nem messze található másik alternatív exonjához, az eddig ismeretlen funkciójú D exonhoz kötődik.

8.2. Egyéb DLC kötőpartnerek vizsgálata

A miozin-5-ön kívül egyéb DLC kötőpartnerekkel is végeztünk vizsgálatokat, olyanokkal, amikről kimutatták, hogy kötődnek a DLC-hez, de a miozinhoz hasonlóan szintén nem tartalmazzák a konszenzus DLC kötőhelyet, illetve több lehetséges kötőhelyet is tartalmaznak. Egyik ilyen kiemelt fontosságú fehérje a Pak1. Munkánk során sikerült élesztő-két-hibrid rendszerben leszűkíteni a Pak1 DLC-kötő régióját a Ser204-Thr229 aminosavak közé, és kimutattuk, hogy a korábbi feltételezésekkel ellentétben a Pak1 is a DLC kötőárkába köt. Eredményeinket egy másik csoport is megerősítette – tovább pontosítva a kötőrégiót (212-224) – valamint meghatározták a szerkezetet is (Lightcap *et al.*, 2008, 44. ábra).



44. ábra: A Pak1-DLC komplex szerkezete (Lightcap *et al.*, 2008).

Az IκBα és a PKIα DLC-hez való kötődését sem élesztő-két-hibrid rendszerben, sem CD-vel, sem géliszűrőssel, sem pedig *in vitro* „pull-down” vizsgálatokkal nem sikerült igazolnunk.

Az ATMIN (szekvenciája alapján több DLC kötőhelyet tartalmazó) fehérjében élesztő-két-hibrid rendszerben legalább két (csoportunk által elvégzett későbbi vizsgálatok szerint legalább 6, Rapali *et al.*, 2011) DLC kötőhelyet sikerült kimutatnunk. Ebben az

esetben szintén szerkezetstabilizáló funkciót tulajdonítunk a DLC-nek, az előbb részletezett miozin-5a kötődéséhez hasonlóan. Ezt a szerkezetnélküli régióhoz való kötődést és stabilizálást más DLC kötőpartnerek, például a Bim és Bmf (Hinds *et al.*, 2007), valamint a DIC esetében is igazolták (Barbar, 2008). A kötőhely szerkezetnélküliségét *in silico* szekvenciaelemzéssel munkacsoportunk is kimutatta a kötőpartnerek döntő többsége esetében (Hodi *et al.*, 2007; Rapali *et al.* 2011). Mai tudásunk szerint ez, azaz a kötőmotívum szerkezetnélkülisége lehet a kulcsa a sok különböző kötőpartnerhez kapcsolódás képességének. A DLC újonnan valószínűsíthető funkciója tehát különböző fehérjék szerkezetének stabilizálása, szabályozása, chaperon-szerű csomóponti fehérjeként kötődve hozzájuk.

8.3. A DLC dimer-monomer átmenet szabályozó szerepe

Az előbb említett Pak1-ről (p21-aktivált kináz) Vadlamudi és mtsi. 2004-ben publikálták, hogy nem csak köti, hanem foszforilálja is a DLC-t. Kísérleteinkben a Pak1 nem a DLC-t foszforilálta, hanem csak a fehérje előállításához szükséges címkén levő trombin hasítóhelyet, így ezt az eredményt cáfoljuk. A hasítóhely foszforilációját megerősítették Lightcap és mtsi. (2008), valamint bizonyították, hogy a Pak1-DLC kapcsolatnak a Pak1 sejtmagi transzportjában van jelentősége, nem pedig foszforilációs szempontból (Lightcap *et al.*, 2009). Fontos lenne ugyanakkor további kísérleteket végezni annak kiderítésére, hogy melyik protein-kináz foszforilálja a DLC-t a Ser88-as oldalláncon, mert ez a foszforiláció jelentősen befolyásolja a DLC negyedleges szerkezetét, és ezen keresztül kötődését partnerfehérjeihez.

Gélszűrőssel, natív PAGE-dzsel, CD spektroszkópiával és analitikai ultracentrifugálással ugyanis kimutattuk, hogy a foszforilációt mimikáló DLC-S88E konstrukció natív körülmények között – a vad típussal ellentétben – túlnyomórészt monomer formában van jelen. Lightcap és mtsi. (2008) ezt is megerősítették. Song és mtsi. szerint (2007) azért esik szét a DLC dimer a foszforiláció hatására, mert mindkét Ser88 hidroxil csoportja H-hidat képez a másik lánc Ser88 peptidgerincének karbonil-csoportjával. Xiao és mtsi. 2010-ben molekuladinamikai szimulációval azt találták, hogy a térben közeli foszforiláció taszító hatása miatt vízmolekulák kerülnek a dimerizációs felszín közelébe. E vízmolekulák megzavarják a két – szintén térben közel levő – His55 körüli hidrogén hidakat, amiktől a hisztidinek protonálódnak, így destabilizálódik a DLC dimer. Ez megmagyarázhatja, hogy

méréseink során miért viselkedett a DLC-S88E nagyon hasonlóan a savas közegben (pH 3) levő vad típusú DLC-hez.

Mivel a DLC kötőárka a két monomer közti völgyben található – ami a dimer szétesésével eltűnik –, logikus lenne, hogy a monomer formához ne tudjanak kötődni partnerfehérjéi. Gélszűrőssel és natív gélen végzett kötősvizsgálataink során a monomer (foszforilációt mimikáló) DLC monomer kötőpartnerrel nem is mutatott kötődést, dimerrel azonban igen. Több csoport is végzett hasonló kísérleteket (6. táblázat), melyek alapján úgy tűnik, hogy a foszforilációt mimikáló DLC erős dimer kötőpartnereihez köt, monomerekhez nem; gyenge dimer kötőpartner esetében pedig ellentmondások az eredmények. Rapali Péter és Radnai László kollégáim későbbi vizsgálata alapján (Radnai *et al.*, 2010) a monomer DLC monomer Bmf fragmentumhoz történő kötődése fluoreszcencia anizotrópiával kimutató ugyan, de a kötőerősség mindössze harmincad része a dimer DLC – Bmf fragmentum kötőerősségének, ami a Bmf monomer volta miatt amúgy sem túl erős (nagyságrendileg a monomer DLC – dimer miozin kötőerősségével egyezik meg). Egy másik erős kötőpartnerrel (a Swallow fehérjével) Benison és mtsi. (2009) sikeresen ki is kristályosították a DLC-S88E-t.

6. táblázat: A monomer DLC kötődése néhány kötőpartner esetében (irodalmi adatok alapján).

kötő-partner	a kötőpartner monomer/dimer volta	monomer DLC típusa	kötés létrejött (+) nem jött létre (-)	módszer	forrás
Bim	monomer	DLC-Δ2 (DLC1-87)	-	GST-„pull-down” assay	2004 - Vadlamudi
DIC	(gyenge [*]) dimer kötőpartner	DLC-Δ2 és DLC-S88E	+ +	GST-„pull-down” assay	2007- Song
Swa	(erős [*]) dimer kötőpartner	DLC-Δ2 és DLC-S88E	+ +	GST-„pull-down” assay	2007- Song
Pak1	monomer Pak1 peptid	DLC-S88D	-	géliszűrés, natív PAGE és nikkell „pull-down” assay	2008 Lightcap
DIC	(gyenge [*]) dimer kötőpartner	DLC-S88D	-	(nem kötött, valószínűsíthetőleg géliszűrés, natív PAGE és nikkell „pull-down” assay)	2008 Lightcap

^{*} Hall és mtsi. (2008) ITC mérése alapján a DLC dimer a Bim-et és az Swa-t erősen, míg a DIC-et gyengén köti.

Tehát a foszforilált DLC-hez is tudnak kötődni partnerei, ami azt feltételezi, hogy a foszforilációkor bekövetkező monomer forma felé való eltolódást egy „erős” kötőpartner kompenzálni tudja azzal, hogy kivonja a szabad dimer DLC-t a rendszerből (tömeghatás elve), mintegy „visszadimerizálva” azt. Feltételezésünk később bizonyítást nyert: Lightcap és

mtsi. (2008) mérései szerint a DLC dimer K_d -je 160 nM, míg (az ő kísérleteikben használt DLC-S88D) monoméré $\sim 510 \mu\text{M}$. Mindez megmagyarázza, hogy gélszűrőssel, CD-vel és natív géllal vizsgálva tényleg a monomer forma kerül túlsúlyba. A leírtak alapján valószínűsítjük, hogy a foszforilációval a DLC ugyanúgy különbséget tud tenni *in vivo* és kötőpartnerei között, mint *in vitro* a kötés kimutatására használt módszerek között. A foszforilált és nem foszforilált DLC közötti nagy affinitás-különbség a partnerek felé tehát nagyon valószínűsíti a foszforiláció szabályozásban betöltött szerepét; a foszforilációért felelős protein-kináz megtalálásával pedig pontosabb választ adhatunk majd a szabályozás részleteire.

8.4. További kísérletek a DLC-vel munkacsoportunkban

- A DLC és kötőpartnerei későbbi részletes termodinamikai és kinetikai vizsgálatát Radnai László, Rapali Péter és Süveges Dániel írták le (közös publikáció, Radnai *et al.*, 2010)
- A DLC kötőpartnereinek további *in silico* szerkezeti jellemzését, miszerint egy *coiled-coil* domén közeli, rendezetlen régióhoz kötődik általában a DLC, Szenes Áron végezte (Hodi *et al.*, 2007)
- A DLC foszforilációjával a továbbiakban Molnár Tamás foglalkozott (Molnár *et al.*, 2009, közlemény megírás alatt)
- Az ATMIN fehérjén levő többszörös DLC kötőhelyet (DNS hibajavítással kapcsolatos sejtmagi fókuszok) Rapali Péter térképezte fel (Rapali *et al.*, 2011)
- A DLC-t a miozin-5a peptiddel Radnai László kristályosította (közlemény megírás alatt)
- A DLC kötőmotívum-szekvencia *in vitro* evolúcióval történő jellemzését és további kötőpartnerek jóslását a konszenzus szekvencia alapján Rapali Péter végezte (Rapali *et al.*, 2011)

9. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani mindenkinek, aki segítségemre volt a kutatás, illetve a dolgozat megírása során.

Elsősorban szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Nyitrai Lászlónak, hogy végig támogatott kutatómunkám alatt, majd miután úgy alakult, hogy elkerültem a tanszékről, sem adta fel, hogy bíztasson a dolgozat megírására. Gráf László professzornak köszönöm, hogy lehetőségem volt a doktori iskola keretei között kutatni.

Ignatio Rodriguez Crespo-nak köszönöm, hogy Madridban a laboratóriumában kutathattam, és megtanulhattam az élesztő-két-hibrid rendszert.

Szeretném megköszönni Schlett Katalinnak és Tárnok Krisztiánnak a sejtbiológiában nyújtott segítségüket.

Dr. Buday Lászlónak a kináz aktivitás méréseket.

Kardos Józsefnek, hogy segített az ITC mérések során.

Németh Attilának, hogy megtanított a CD spektroszkópiára.

Bodor Andreának az NMR méréseket.

Hetényi Csabának az *in silico* dokkolást.

Walter F. Stafford-nak (BBRI, Boston, USA) az analitikai ultracentrifugálást.

Szenes Áronnak az *in silico* DLC kötőhely szerkezetjelölést.

Patthy Andrásnak a peptidek szintézisét.

Dr. Hegyi Györgynek, hogy az elméleti kérdéseimen túl akkor is rögtön segített, ha valamilyen műszerrel adódtak gondok.

Kovács Erika, Süveges Dániel, Radnai László, Molnár Tamás, Rapali Péter és Kiss Bence munkatársaimnak, hogy jó volt velük dolgozni, mindig számíthattam a segítségükre, valamint hogy volt, aki folytassa a DLC-vel való kísérleteimet.

Dr. Kovács Mihálynak és Tóth Juditnak, hogy sokat tanulhattam tőlük, a kezdeti lépésektől egészen a komolyabb mérések megvitatásáig.

Kurucz-Váradik Katalinnak a laboratóriumban nyújtott segítségét.

Szeretnék köszönetet mondani az egész Biokémiai Tanszéknek a konstruktív légkörért, a jó hangulatért, és hogy bárkihez fordulhattam segítségért.

Végül, de nem utolsósorban szeretném megköszönni Családomnak a sok biztatást és az anyagi támogatást.

10. A dolgozat alapjául szolgáló közlemények

Referált nemzetközi folyóiratban megjelent közlemények:

Hodi Zs., Nemeth A., Radnai L., Hetenyi Cs., Schlett K., Bodor A., Perczel A., Nyitray L. (2006): Alternatively spliced exon B of myosin Va is essential for binding the tail-associated light chain shared by dynein. *Biochemistry* 45(41):12582-12595

Radnai L., Rapali P., **Hodi Zs.**, Süveges D., Molnar T., Kiss B., Becsi B., Erdodi F., Buday L., Kardos J., Kovacs M., Nyitray L. (2010): Affinity, avidity and kinetics of target sequence binding to LC8 dynein light chain isoforms. *J. Biol. Chem.* 285(49): 38649-38657

Konferencia kiadványok:

Radnai L., Rapali P., Kardos J., Süveges D., Molnár T., Kiss B., **Hódi Zs.**, Nyitray L. (2008): DLC: egy „csomóponti” fehérje kölcsönhatási hálózatának szerkezeti alapjai. *A Magyar Biokémiai Egyesület 2008. évi vándorgyűlése, Szeged (Biokémia 32(3):68)*

Rapali P., Radnai L., Kardos J., Süveges D., Molnar T., Kiss B., **Hodi Zs.**, Nyitray L. (2008): Mechanism of DLC binding to multiple protein partners. *4th Central European Conference: Chemistry towards Biology, Dobogókő*

Hodi Zs., Rapali P., Radnai L., Molnar T., Szenes A., Kardos J., Buday L., Stafford W.F., and Nyitray L. (2007): The LC8 family of dynein light chains: multifunctional chaperon-like proteins. *FEBS Journal*, 274: 106

Hodi Zs., Rapali P., Radnai L., Molnar T., Szenes A., Kardos J., Buday L., Stafford W.F., Nyitray L. (2007): DLC1 and DLC2: Tail Light Chain Subunits of Dynein and Myosin Va Motor Proteins and Beyond. *European Biophysics Journal, IV. International Conference on Molecular Recognition, Pécs, Hungary*

Hódi Zs., Molnár T., Buday L., Schlett K., Rapali P., Kardos J., Stafford W.F., Nyitray L. (2007): A DLC foszforilációja – egy érdekes szabályozás. *A Magyar Biokémiai Egyesület 2007. évi vándorgyűlése, Debrecen (Biokémia 31(3):61)*

Szenes Á., **Hódi Zs.**, Tompa P., Nyitray L. (2007): Az LC8 dinein könnyű láncok szerkezet nélküli fehérjékhez vagy doménekhez kötődnek. *A Magyar Biokémiai Egyesület 2007. évi vándorgyűlése, Debrecen (Biokémia 31(3):67)*

Radnai L., Süveges D., Pohl G., Stráner P., **Hódi Zs.**, Molnár T., Nyitray L. (2007): Új *Escherichia coli* expressziós vektorok tervezése és tesztelése. *A Magyar Biokémiai Egyesület 2007. évi vándorgyűlése, Debrecen (Biokémia 31(3):66)*

Hódi Zs., Németh A., Kardos J., Radnai L., Hetényi Cs., Schlett K., Bodor A., Perczel A., Nyitray L. (2006): Miozin Va: egy 3 aminosavat kódoló alternatív exon és egy dinein-könnyűlánc. *A Magyar Biokémiai Egyesület 2006. évi vándorgyűlése, Pécs (Biokémia 30(3):71)*

Hódi Zs., Nemeth A., Hetenyi Cs., Bodor A., Perczel A., Nyitray L. (2005): Alternatively spliced exon B of myosin Va is essential for binding of the tail light chain shared by dynein. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 26:73

Bodor A., Perczel A., **Hódi Zs.**, Nyitray L. (2005): NMR Investigation Of Binding Between Dynein Light Chain To A Non-Coiled-Coil Tail Domain Of Myosin-V. *EUROMAR 2005 /EENC, Veldhoven, The Netherlands*

Hódi Zs., Nemeth A., Kovacs E., Hetenyi Cs., Bodor A., Perczel A., Nyitray L. (2005): The dynein light chain binds to a non-coiled-coil tail domain of myosin-Va that includes an alternatively spliced exon coding for three amino acid residues. *FEBS Journal*, 272 (suppl.1):335

Hódi Zs., Németh A., Farkas L., Nyitray L. (2004): Egy különleges nem-konvencionális miozin könnyű lánc. *A Magyar Biokémiai Egyesület 9. vándorgyűlése, Sopron p38.*

11. Irodalomjegyzék

- Anbazhagan, V., Sankhala, R.S., Singh, B.P. and Swamy, M.J. (2011) Isothermal Titration Calorimetric Studies on the Interaction of the Major Bovine Seminal Plasma Protein, PDC-109 with Phospholipid Membranes. *PLoS ONE*, **6**, e25993.
- Barbar, E. (2008) Dynein light chain LC8 is a dimerization hub essential in diverse protein networks. *Biochemistry*, **47**, 503-508.
- Barbar, E., Kleinman, B., Imhoff, D., Li, M., Hays, T.S. and Hare, M. (2001) Dimerization and folding of LC8, a highly conserved light chain of cytoplasmic dynein. *Biochemistry*, **40**, 1596-1605.
- Benashski, S.E., Harrison, A., Patel-King, R.S. and King, S.M. (1997) Dimerization of the highly conserved light chain shared by dynein and myosin V. *J Biol Chem*, **272**, 20929-20935.
- Benison, G. and Barbar, E. (2009) NMR analysis of dynein light chain dimerization and interactions with diverse ligands. *Methods Enzymol*, **455**, 237-258.
- Benison, G., Chiodo, M., Karplus, P.A. and Barbar, E. (2009) Structural, thermodynamic, and kinetic effects of a phosphomimetic mutation in dynein light chain LC8. *Biochemistry*, **48**, 11381-11389.
- Benison, G., Karplus, P.A. and Barbar, E. (2007) Structure and dynamics of LC8 complexes with KXTQT-motif peptides: swallow and dynein intermediate chain compete for a common site. *J Mol Biol*, **371**, 457-468.
- Benison, G., Karplus, P.A. and Barbar, E. (2008) The interplay of ligand binding and quaternary structure in the diverse interactions of dynein light chain LC8. *J Mol Biol*, **384**, 954-966.
- Benison, G., Nyarko, A. and Barbar, E. (2006) Heteronuclear NMR identifies a nascent helix in intrinsically disordered dynein intermediate chain: implications for folding and dimerization. *J Mol Biol*, **362**, 1082-1093.
- Berger, B., Wilson, D.B., Wolf, E., Tonchev, T., Milla, M. and Kim, P.S. (1995) Predicting Coiled Coils by Use of Pairwise Residue Correlations. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**, 8259-8263.
- Buday, L. and Tompa, P. (2010) Functional classification of scaffold proteins and related molecules. *FEBS J*, **277**, 4348-4355.
- Cao, T.T., Chang, W., Masters, S.E. and Mooseker, M.S. (2004) Myosin-Va binds to and mechanochemically couples microtubules to actin filaments. *Mol Biol Cell*, **15**, 151-161.
- Cheney, R.E., O'Shea, M.K., Heuser, J.E., Coelho, M.V., Wolenski, J.S., Espreafico, E.M., Forscher, P., Larson, R.E. and Mooseker, M.S. (1993) Brain myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity. *Cell*, **75**, 13-23.
- Claverie, J.M., Dreux, H. and Cohen, R. (1975) Sedimentation of generalized systems of interacting particles. I. Solution of systems of complete Lamm equations. *Biopolymers*, **14**, 1685-1700.
- Claverie, J.M. (1976) Sedimentation of generalized systems of interacting particles III. Concentration dependent sedimentation and extension to other transport methods. *Biopolymers*, **15**, 843-857.
- Colman, R., Hussain, A., Goodall, M., Young, S.P., Pankhurst, T., Lu, X., Jefferis, R., Savage, C.O. and Williams, J.M. (2007) Chimeric antibodies to proteinase 3 of IgG1 and IgG3 subclasses induce different magnitudes of functional responses in neutrophils. *Ann Rheum Dis*, **66**, 676-682.
- Compton, L.A. and Johnson, W.C., Jr. (1986) Analysis of protein circular dichroism spectra for secondary structure using a simple matrix multiplication. *Anal Biochem*, **155**, 155-167.
- Cory, S. and Adams, J.M. (2002) The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*, **2**, 647-656.

- Crepieux, P., Kwon, H., Leclerc, N., Spencer, W., Richard, S., Lin, R. and Hiscott, J. (1997) I kappaB alpha physically interacts with a cytoskeleton-associated protein through its signal response domain. *Mol Cell Biol*, **17**, 7375-7385.
- Day, C.L., Puthalakath, H., Skea, G., Strasser, A., Barsukov, I., Lian, L.Y., Huang, D.C. and Hinds, M.G. (2004) Localization of dynein light chains 1 and 2 and their pro-apoptotic ligands. *Biochem J*, **377**, 597-605.
- Dick, T., Surana, U. and Chia, W. (1996) Molecular and genetic characterization of SLC1, a putative *Saccharomyces cerevisiae* homolog of the metazoan cytoplasmic dynein light chain 1. *Mol Gen Genet*, **251**, 38-43.
- Dienstbier, M., Boehl, F., Li, X. and Bullock, S.L. (2009) Egalitarian is a selective RNA-binding protein linking mRNA localization signals to the dynein motor. *Genes Dev*, **23**, 1546-1558.
- Dosztányi, Z., Csizmók, V., Tompa, P. and Simon, I. (2005) The pairwise energy content estimated from amino acid composition discriminates between folded and intrinsically unstructured proteins. *J Mol Biol*, **347**, 827-839.
- Dosztányi, Z., Csizmok, V., Tompa, P. and Simon, I. (2005) IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content. *Bioinformatics*, **21**, 3433-3434.
- Dragan, A.I. and Privalov, P.L. (2002) Unfolding of a leucine zipper is not a simple two-state transition. *J Mol Biol*, **321**, 891-908.
- Espindola, F.S., Suter, D.M., Partata, L.B., Cao, T., Wolenski, J.S., Cheney, R.E., King, S.M. and Mooseker, M.S. (2000) The light chain composition of chicken brain myosin-Va: calmodulin, myosin-II essential light chains, and 8-kDa dynein light chain/PIN. *Cell Motil Cytoskeleton*, **47**, 269-281.
- Evans, L.L., Lee, A.J., Bridgman, P.C. and Mooseker, M.S. (1998) Vesicle-associated brain myosin-V can be activated to catalyze actin-based transport. *J Cell Sci*, **111** (Pt 14), 2055-2066.
- Fan, J., Zhang, Q., Tochio, H., Li, M. and Zhang, M. (2001) Structural basis of diverse sequence-dependent target recognition by the 8 kDa dynein light chain. *J Mol Biol*, **306**, 97-108.
- Fan, J.S., Zhang, Q., Li, M., Tochio, H., Yamazaki, T., Shimizu, M. and Zhang, M. (1998) Protein inhibitor of neuronal nitric-oxide synthase, PIN, binds to a 17-amino acid residue fragment of the enzyme. *J Biol Chem*, **273**, 33472-33481.
- Fan, J.S., Zhang, Q., Tochio, H. and Zhang, M. (2002) Backbone dynamics of the 8 kDa dynein light chain dimer reveals molecular basis of the protein's functional diversity. *J Biomol NMR*, **23**, 103-114.
- Fodor, K., Harmat, V., Hetényi, C., Kardos, J., Antal, J., Perczel, A., Patthy, A., Katona, G. and Gráf, L. (2005) Extended intermolecular interactions in a serine protease-canonical inhibitor complex account for strong and highly specific inhibition. *J Mol Biol*, **350**, 156-169.
- Fuhrmann, J.C., Kins, S., Rostaing, P., El Far, O., Kirsch, J., Sheng, M., Triller, A., Betz, H. and Kneussel, M. (2002) Gephyrin interacts with Dynein light chains 1 and 2, components of motor protein complexes. *J Neurosci*, **22**, 5393-5402.
- Greenfield, N.J., Montelione, G.T., Farid, R.S. and Hitchcock-DeGregori, S.E. (1998) The structure of the N-terminus of striated muscle alpha-tropomyosin in a chimeric peptide: nuclear magnetic resonance structure and circular dichroism studies. *Biochemistry*, **37**, 7834-7843.
- Haraguchi, K., Satoh, K., Yanai, H., Hamada, F., Kawabuchi, M. and Akiyama, T. (2000) The hDLG-associated protein DAP interacts with dynein light chain and neuronal nitric oxide synthase. *Genes Cells*, **5**, 905-911.

- Hall, J., Hall, A., Pursifull, N. and Barbar, E. (2008) Differences in dynamic structure of LC8 monomer, dimer, and dimer-peptide complexes. *Biochemistry*, **47**, 11940-11952.
- Herzig, R.P., Andersson, U. and Scarpulla, R.C. (2000) Dynein light chain interacts with NRF-1 and EWG, structurally and functionally related transcription factors from humans and drosophila. *J Cell Sci*, **113 Pt 23**, 4263-4273.
- Hetényi, C., Maran, U. and Karelson, M. (2003) A comprehensive docking study on the selectivity of binding of aromatic compounds to proteins. *J Chem Inf Comput Sci*, **43**, 1576-1583.
- Hinds, M.G., Smits, C., Fredericks-Short, R., Risk, J.M., Bailey, M., Huang, D.C. and Day, C.L. (2007) Bim, Bad and Bmf: intrinsically unstructured BH3-only proteins that undergo a localized conformational change upon binding to prosurvival Bcl-2 targets. *Cell Death Differ*, **14**, 128-136.
- Huang, J.D., Mermall, V., Strobel, M.C., Russell, L.B., Mooseker, M.S., Copeland, N.G. and Jenkins, N.A. (1998) Molecular genetic dissection of mouse unconventional myosin-VA: tail region mutations. *Genetics*, **148**, 1963-1972.
- Illés, A., Enyedi, B., Tamás, P., Balázs, A., Bogel, G. and Buday, L. (2006) Inducible phosphorylation of cortactin is not necessary for cortactin-mediated actin polymerisation. *Cell Signal*, **18**, 830-840.
- ITC Data Analysis in Origin® (1998) Tutorial Guide Version 5.0.
- Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Taylor, B.A. and Lee, B.K. (1981) Dilute (d) coat colour mutation of DBA/2J mice is associated with the site of integration of an ecotropic MuLV genome. *Nature*, **293**, 370-374.
- Jung, Y., Kim, H., Min, S.H., Rhee, S.G. and Jeong, W. (2008) Dynein light chain LC8 negatively regulates NF- κ B through the redox-dependent interaction with I κ B α . *J Biol Chem*, **283**, 23863-23871.
- Kamath, R.S., Fraser, A.G., Dong, Y., Poulin, G., Durbin, R., Gotta, M., Kanapin, A., Le Bot, N., Moreno, S., Sohrmann, M., Welchman, D.P., Zipperlen, P. and Ahringer, J. (2003) Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature*, **421**, 231-237.
- Karcher, R.L., Deacon, S.W. and Gelfand, V.I. (2002) Motor-cargo interactions: the key to transport specificity. *Trends Cell Biol*, **12**, 21-27.
- King, S.M. (2000) The dynein microtubule motor. *Biochim Biophys Acta*, **1496**, 60-75.
- Krementsov, D.N., Kremntsova, E.B. and Trybus, K.M. (2004) Myosin V: regulation by calcium, calmodulin, and the tail domain. *J Cell Biol*, **164**, 877-886.
- Lajoix, A.D., Gross, R., Aknin, C., Dietz, S., Granier, C. and Laune, D. (2004) Cellulose membrane supported peptide arrays for deciphering protein-protein interaction sites: the case of PIN, a protein with multiple natural partners. *Mol Divers*, **8**, 281-290.
- Lambert, J., Naeyaert, J.M., Callens, T., De Paepe, A. and Messiaen, L. (1998a) Human myosin V gene produces different transcripts in a cell type-specific manner. *Biochem Biophys Res Commun*, **252**, 329-333.
- Lambert, J., Onderwater, J., Vander Haeghen, Y., Vancollie, G., Koerten, H.K., Mommaas, A.M. and Naeyaert, J.M. (1998b) Myosin V colocalizes with melanosomes and subcortical actin bundles not associated with stress fibers in human epidermal melanocytes. *J Invest Dermatol*, **111**, 835-840.
- Langford, G.M. (2002) Myosin-V, a versatile motor for short-range vesicle transport. *Traffic*, **3**, 859-865.
- Lapierre, L.A., Kumar, R., Hales, C.M., Navarre, J., Bhartur, S.G., Burnette, J.O., Provance, D.W., Jr., Mercer, J.A., Bahler, M. and Goldenring, J.R. (2001) Myosin vb is associated with plasma membrane recycling systems. *Mol Biol Cell*, **12**, 1843-1857.

- Lau, S.Y., Taneja, A.K. and Hodges, R.S. (1984) Synthesis of a model protein of defined secondary and quaternary structure. Effect of chain length on the stabilization and formation of two-stranded alpha-helical coiled-coils. *J Biol Chem*, **259**, 13253-13261.
- Li, X.D., Jung, H.S., Mabuchi, K., Craig, R. and Ikebe, M. (2006) The globular tail domain of myosin Va functions as an inhibitor of the myosin Va motor. *J Biol Chem*, **281**, 21789-21798.
- Li, X.D., Jung, H.S., Wang, Q., Ikebe, R., Craig, R. and Ikebe, M. (2008) The globular tail domain puts on the brake to stop the ATPase cycle of myosin Va. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 1140-1145.
- Li, X., Romero P., Rani M., Dunker A.K. and Obradovic Z. (1999) Predicting protein disorder for N-, C-, and internal regions. *Genome Informatics*, **10**, 30-40.
- Liang, J., Jaffrey, S.R., Guo, W., Snyder, S.H. and Clardy, J. (1999) Structure of the PIN/LC8 dimer with a bound peptide. *Nat Struct Biol*, **6**, 735-740.
- Lightcap, C.M., Kari, G., Arias-Romero, L.E., Chernoff, J., Rodeck, U. and Williams, J.C. (2009) Interaction with LC8 is required for Pak1 nuclear import and is indispensable for zebrafish development. *PLoS One*, **4**, e6025.
- Lightcap, C.M., Sun, S., Lear, J.D., Rodeck, U., Polenova, T. and Williams, J.C. (2008) Biochemical and structural characterization of the Pak1-LC8 interaction. *J Biol Chem*, **283**, 27314-27324.
- Lindahl, E., Hess, B. and van der Spoel D. (2001). GROMACS 3.0: A package for molecular simulation and trajectory analysis. *J. Mol. Model*, **7**, 306-317.
- Linding, R., Russell, R.B., Neduva V. and Gibson T.J. (2003) GlobPlot: Exploring protein sequences for globularity and disorder. *Nucleic Acids Res*, **31**, 3701-3708.
- Liu, J., Taylor, D.W., Krementsova, E.B., Trybus, K.M. and Taylor, K.A. (2006) Three-dimensional structure of the myosin V inhibited state by cryoelectron tomography. *Nature*, **442**, 208-211.
- Lo, K.W., Naisbitt, S., Fan, J.S., Sheng, M. and Zhang, M. (2001) The 8-kDa dynein light chain binds to its targets via a conserved (K/R)XTQT motif. *J Biol Chem*, **276**, 14059-14066.
- Lu, J., Sun, Q., Chen, X., Wang, H., Hu, Y. and Gu, J. (2005) Identification of dynein light chain 2 as an interaction partner of p21-activated kinase 1. *Biochem Biophys Res Commun*, **331**, 153-158.
- Makokha, M., Huang, Y.J., Montelione, G., Edison, A.S. and Barbar, E. (2004) The solution structure of the pH-induced monomer of dynein light-chain LC8 from *Drosophila*. *Protein Sci*, **13**, 727-734.
- Mammen, M., Choi, S.K. and Whitesides, G.M. (1998) Polyvalent Interactions in Biological Systems: Implications for Design and Use of Multivalent Ligands and Inhibitors. *Angew Chem Int Edit*, **37**, 2755-2794.
- Martinez-Moreno, M., Navarro-Lerida, I., Roncal, F., Albar, J.P., Alonso, C., Gavilanes, F. and Rodriguez-Crespo, I. (2003) Recognition of novel viral sequences that associate with the dynein light chain LC8 identified through a pepscan technique. *FEBS Lett*, **544**, 262-267.
- Menasche, G., Ho, C.H., Sanal, O., Feldmann, J., Tezcan, I., Ersoy, F., Houdusse, A., Fischer, A. and de Saint Basile, G. (2003) Griscelli syndrome restricted to hypopigmentation results from a melanophilin defect (GS3) or a MYO5A F-exon deletion (GS1). *J Clin Invest*, **112**, 450-456.
- Miller, K.E. and Sheetz, M.P. (2000) Characterization of myosin V binding to brain vesicles. *J Biol Chem*, **275**, 2598-2606.
- Molnár, T., Rapali, P., Radnai, L., Süveges, D. és Nyitray L. (2009) Az LC8 dinein-könnyűlánc foszforiláció általi szabályozásának három mechanizmusa. *Biokémia* 33(3) 14.

- Morgan, J.L., Song, Y. and Barbar, E. (2011) Structural dynamics and multiregion interactions in dynein-dynactin recognition. *J Biol Chem*, **286**, 39349-39359.
- Morris, G.M., Goodsell, D.S., Halliday, R.S., Huey, R., Hart, W.E., Belew, R.K. and Olson, A.J. (1998) Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function. *J Comput Chem*, **19**, 1639-1662.
- Naisbitt, S., Valtchanoff, J., Allison, D.W., Sala, C., Kim, E., Craig, A.M., Weinberg, R.J. and Sheng, M. (2000) Interaction of the postsynaptic density-95/guanylate kinase domain-associated protein complex with a light chain of myosin-V and dynein. *J Neurosci*, **20**, 4524-4534.
- Nascimento, A.A., Cheney, R.E., Tauhata, S.B., Larson, R.E. and Mooseker, M.S. (1996) Enzymatic characterization and functional domain mapping of brain myosin-V. *J Biol Chem*, **271**, 17561-17569.
- Nyarko, A., Hare, M., Hays, T.S. and Barbar, E. (2004) The intermediate chain of cytoplasmic dynein is partially disordered and gains structure upon binding to light-chain LC8. *Biochemistry*, **43**, 15595-15603.
- Pace, C.N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. and Gray, T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci*, **4**, 2411-2423.
- Poisson, N., Real, E., Gaudin, Y., Vaney, M.C., King, S., Jacob, Y., Tordo, N. and Blondel, D. (2001) Molecular basis for the interaction between rabies virus phosphoprotein P and the dynein light chain LC8: dissociation of dynein-binding properties and transcriptional functionality of P. *J Gen Virol*, **82**, 2691-2696.
- Puthalakath, H., Villunger, A., O'Reilly, L.A., Beaumont, J.G., Coultas, L., Cheney, R.E., Huang, D.C. and Strasser, A. (2001) Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science*, **293**, 1829-1832.
- Radnai, L., Rapali, P., Hódi, Z., Süveges, D., Molnár, T., Kiss, B., Bécsi, B., Erdödi, F., Buday, L., Kardos, J., Kovács, M. and Nyitray, L. (2010) Affinity, avidity, and kinetics of target sequence binding to LC8 dynein light chain isoforms. *J Biol Chem*, **285**, 38649-38657.
- Rapali, P., Szenes, Á., Radnai, L., Bakos, A., Pál, G. and Nyitray, L. (2011) DYNLL/LC8: a light chain subunit of the dynein motor complex and beyond. *FEBS J*, **278**, 2980-2996.
- Rapali, P., García-Mayoral, M.F., Martínez-Moreno, M., Tárnok, K., Schlett, K., Albar, J.P., Bruix, M., Nyitray, L. and Rodríguez-Crespo, I. (2011) LC8 dynein light chain (DYNLL1) binds to the C-terminal domain of ATM-interacting protein (ATMIN/ASCIZ) and regulates its subcellular localization. *Biochem Biophys Res Commun*, **414**, 493-498.
- Rapali, P., Radnai, L., Süveges, D., Harmat, V., Tölgyesi, F., Wahlgren, W.Y., Katona, G., Nyitray, L. and Pál, G. (2011) Directed evolution reveals the binding motif preference of the LC8/DYNLL hub protein and predicts large numbers of novel binders in the human proteome. *PLoS One*, **6**, e18818.
- Rayala, S.K., den Hollander, P., Balasenthil, S., Yang, Z., Broadus, R.R. and Kumar, R. (2005) Functional regulation of oestrogen receptor pathway by the dynein light chain 1. *EMBO Rep*, **6**, 538-544.
- Rodríguez-Crespo, I., Straub, W., Gavilanes, F. and Ortiz de Montellano, P.R. (1998) Binding of dynein light chain (PIN) to neuronal nitric oxide synthase in the absence of inhibition. *Arch Biochem Biophys*, **359**, 297-304.
- Rodríguez-Crespo, I., Yelamos, B., Roncal, F., Albar, J.P., Ortiz de Montellano, P.R. and Gavilanes, F. (2001) Identification of novel cellular proteins that bind to the LC8 dynein light chain using a pepscan technique. *FEBS Lett*, **503**, 135-141.
- Rodríguez, O.C. and Cheney, R.E. (2002) Human myosin-Vc is a novel class V myosin expressed in epithelial cells. *J Cell Sci*, **115**, 991-1004.
- Rohl, C.A. and Baldwin, R.L. (1997) Comparison of NH exchange and circular dichroism as techniques for measuring the parameters of the helix-coil transition in peptides. *Biochemistry*, **36**, 8435-8442.

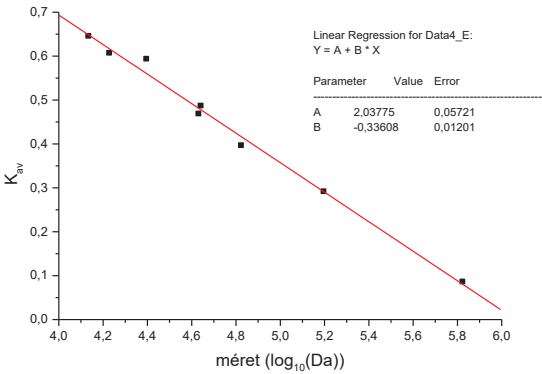
- Roland, J.T., Lapierre, L.A. and Goldenring, J.R. (2009) Alternative splicing in class V myosins determines association with Rab10. *J Biol Chem*, **284**, 1213-1223.
- Rost, B. and Sander, C. (1993) Prediction of protein secondary structure at better than 70% accuracy. *J Mol Biol*, **232**, 584-599.
- Schagger, H. and von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*, **166**, 368-379.
- Schlett, K. and Madarasz, E. (1997) Retinoic acid induced neural differentiation in a neuroectodermal cell line immortalized by p53 deficiency. *J Neurosci Res*, **47**, 405-415.
- Schnorrer, F., Bohmann, K. and Nusslein-Volhard, C. (2000) The molecular motor dynein is involved in targeting swallow and bicoid RNA to the anterior pole of Drosophila oocytes. *Nat Cell Biol*, **2**, 185-190.
- Sellers, J.R. and Knight, P.J. (2007) Folding and regulation in myosins II and V. *J Muscle Res Cell Motil*, **28**, 363-370.
- Sellers, J.R. and Veigel, C. (2006) Walking with myosin V. *Curr Opin Cell Biol*, **18**, 68-73.
- Seperack, P.K., Mercer, J.A., Strobel, M.C., Copeland, N.G. and Jenkins, N.A. (1995) Retroviral sequences located within an intron of the dilute gene alter dilute expression in a tissue-specific manner. *Embo J*, **14**, 2326-2332.
- Song, C., Wen, W., Rayala, S.K., Chen, M., Ma, J., Zhang, M. and Kumar, R. (2008) Serine 88 phosphorylation of the 8-kDa dynein light chain 1 is a molecular switch for its dimerization status and functions. *J Biol Chem*, **283**, 4004-4013.
- Song, Y., Benison, G., Nyarko, A., Hays, T.S. and Barbar, E. (2007) Potential role for phosphorylation in differential regulation of the assembly of dynein light chains. *J Biol Chem*, **282**, 17272-17279.
- Sönnichsen, F.D., Van Eyk, J.E., Hodges, R.S. and Sykes, B.D. (1992) Effect of trifluoroethanol on protein secondary structure: an NMR and CD study using a synthetic actin peptide. *Biochemistry*, **31**, 8790-8798.
- Stafford, W. F. (1994). Boundary Analysis in Sedimentation Velocity Experiments. *Methods in Enzymology*, **240**, 478-501.
- Stafford, W.F. and Sherwood, P.J. (2004) Analysis of heterologous interacting systems by sedimentation velocity: curve fitting algorithms for estimation of sedimentation coefficients, equilibrium and kinetic constants. *Biophys Chem*, **108**, 231-243.
- Stoscheck, C.M. (1990) Quantitation of protein. *Methods Enzymol*, **182**, 50-68.
- Takagishi, Y., Oda, S., Hayasaka, S., Dekker-Ohno, K., Shikata, T., Inouye, M. and Yamamura, H. (1996) The dilute-lethal (dl) gene attacks a Ca²⁺ store in the dendritic spine of Purkinje cells in mice. *Neurosci Lett*, **215**, 169-172.
- Taylor, K.A. (2007) Regulation and recycling of myosin V. *Curr Opin Cell Biol*, **19**, 67-74.
- Trybus, K.M. (2008) Myosin V from head to tail. *Cell Mol Life Sci*, **65**, 1378-1389. Review.
- Vadlamudi, R.K., Bagheri-Yarmand, R., Yang, Z., Balasenthil, S., Nguyen, D., Sahin, A.A., den Hollander, P. and Kumar, R. (2004) Dynein light chain 1, a p21-activated kinase 1-interacting substrate, promotes cancerous phenotypes. *Cancer Cell*, **5**, 575-585.
- Vale, R.D. (2003) Myosin V motor proteins: marching stepwise towards a mechanism. *J Cell Biol*, **163**, 445-450.

- Wagner, W., Fodor, E., Ginsburg, A. and Hammer, J.A. 3rd. (2006) The binding of DYNLL2 to myosin Va requires alternatively spliced exon B and stabilizes a portion of the myosin's coiled-coil domain. *Biochemistry*, **45**, 11564-11577
- Wang, F., Thirumurugan, K., Stafford, W.F., Hammer, J.A. 3rd, Knight, P.J. and Sellers, J.R. (2004) Regulated conformation of myosin V. *J Biol Chem*, **279**, 2333-2336.
- Wang, L., Hare, M., Hays, T.S. and Barbar, E. (2004) Dynein light chain LC8 promotes assembly of the coiled-coil domain of swallow protein. *Biochemistry*, **43**, 4611-4620.
- Wang, W., Lo, K.W., Kan, H.M., Fan, J.S. and Zhang, M. (2003) Structure of the monomeric 8-kDa dynein light chain and mechanism of the domain-swapped dimer assembly. *J Biol Chem*, **278**, 41491-41499.
- Weil, T.T., Xanthakis, D., Parton, R., Dobbie, I., Rabouille, C., Gavis, E.R. and Davis, I. Distinguishing direct from indirect roles for bicoid mRNA localization factors. *Development*, **137**, 169-176.
- Westbroek, W., Lambert, J., Bahadoran, P., Busca, R., Herteleer, M.C., Smit, N., Mommaas, M., Ballotti, R. and Naeyaert, J.M. (2003) Interactions of human Myosin Va isoforms, endogenously expressed in human melanocytes, are tightly regulated by the tail domain. *J Invest Dermatol*, **120**, 465-475.
- Williams, J.C., Xie, H. and Hendrickson, W.A. (2005) Crystal structure of dynein light chain TcTex-1. *J Biol Chem*, **280**, 21981-21986.
- Wu, X., Rao, K., Bowers, M.B., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. and Hammer, J.A., 3rd. (2001) Rab27a enables myosin Va-dependent melanosome capture by recruiting the myosin to the organelle. *J Cell Sci*, **114**, 1091-1100.
- Wu, X., Wang, F., Rao, K., Sellers, J.R. and Hammer, J.A., 3rd. (2002) Rab27a is an essential component of melanosome receptor for myosin Va. *Mol Biol Cell*, **13**, 1735-1749. Xiao, F., Weng, J., Fan, K. and Wang, W. (2010) Mechanism of Ser88 phosphorylation-induced dimer dissociation in dynein light chain LC8. *J Phys Chem B*, **114**, 15663-15672.
- Yang, Z., Vadlamudi, R.K. and Kumar, R. (2005) Dynein light chain 1 phosphorylation controls macropinocytosis. *J Biol Chem*, **280**, 654-659.
- Yeast Protocols Handbook (Clontech, PT3024-1)
- Yu, J., Yu, L., Chen, Z., Zheng, L., Chen, X., Wang, X., Ren, D. and Zhao, S. (2002) Protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase interacts with protein kinase A inhibitors. *Brain Res Mol Brain Res*, **99**, 145-149.
- Zhadanov, A.B., Provance, D.W., Jr., Speer, C.A., Coffin, J.D., Goss, D., Blixt, J.A., Reichert, C.M. and Mercer, J.A. (1999) Absence of the tight junctional protein AF-6 disrupts epithelial cell-cell junctions and cell polarity during mouse development. *Curr Biol*, **9**, 880-888.

12. Függelék

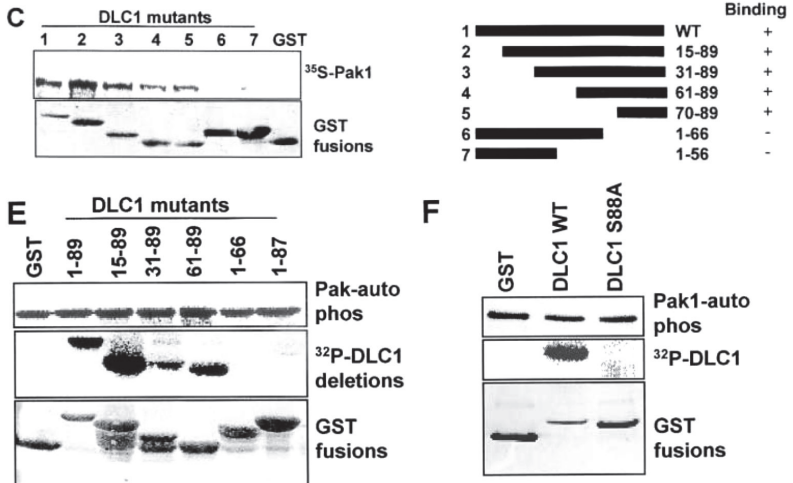
Fehérje	Konstrukciók	Vektorok	Címkék	Felhasználás
Miozin-5a	MV1 MV2 MV3 MV4 MyoV-GTD MyoVΔB-GTD MV M1 M1ΔB+D M11 M11ΔB M2 M3 M4 M6 M7 M7ΔB M8 Peptid	pDsRed2 pET15b pGEX	DsRed– His– GST–	<i>in vitro</i> kötésvizsgálatok transzfektálás
DLC1	DLC1 DLC1-S88E DLC1-Δ2 DLC1-H41Y	pET15b pGEX pGBT9 pEGFP-C1	His– GST– GAL4-BD –GFP	<i>in vitro</i> kötésvizsgálatok élesztő-két-hibrid assay transzfektálás
DLC2	DLC2 DLC2-S88E DLC2- Δ2 DLC2-Y41H	pET15b pGEX pGBT9 pEGFP-C1	His– GST– GAL4-BD –GFP	<i>in vitro</i> kötésvizsgálatok élesztő-két-hibrid assay transzfektálás
nNOS	nNOS fragment	–	–	<i>in vitro</i> kötésvizsgálatok
Bim		–	–	(<i>in silico</i>)
IκBα		pET-21	–His	<i>in vitro</i> kötésvizsgálatok
PK1α		pET-21	–His	<i>in vitro</i> kötésvizsgálatok
ATMIN	ATMIN Fr.1 ATMIN Fr.2 ATMIN Fr.3	pGAD	GAL4-AD	élesztő-két-hibrid assay
Pak1	pak1 pak1 204-273 pak1 204-281 pak1 204-242 pak1 204-229 pak1 220-260 pak1 249-281	pET15b pGAD	His– GAL4-AD	<i>in vitro</i> kötésvizsgálatok élesztő-két-hibrid assay
BMF	BMF	pET15b	His–	<i>in vitro</i> kötésvizsgálatok

Az M1 és M2 miozin fragmentumok DLC-vel történt gélzsűrésének kalibrációja



	monomer moláris tömeg (Da)	dimer moláris tömeg (Da)	\log_{10} monomer moláris tömeg	\log_{10} dimer moláris tömeg	monomerre számolt retenció (perc)	dimerre számolt retenció (perc)	mért retenció (perc)	eltérés a mért retencióban a számolt monomerhez képest (perc)	eltérés a mért retencióban a számolt dimerhez képest (perc)	mért retenció alapján számolt méret (Da)	eltérés a méretben (Da)
Konstrukciók											
DLC	10 630	21 260	4,0265	4,32756	37,66	34,63	34,65	3,01	-0,02	21 183	77
M1	16 970	33 940	4,2297	4,53071	35,62	32,59	29,60	6,02	2,99	67 295	-33 355
M2	15 850	31 700	4,2000	4,50106	35,92	32,89	29,15	6,77	3,74	74 596	-42 896
M1+DLC	27 600	55 200	4,4409	4,74194	33,49	30,47	28,40	5,09	2,07	88 566	-33 366
Kalibráció											
thyroglob.	670 000		5,8261		19,56		19,70	-0,14		648 775	21 225
gammaglob.	158 000		5,1987		25,87		25,85	0,02		158 764	-764
ovalbumin	44 000		4,6435		31,46		31,15	0,31		47 196	-3 196
myoglobin	17 000		4,2304		35,61		35,30	0,31		18 255	-1 255
B12vit.	1 350		3,1303		46,68		42,20	4,48		3 763	-2 413
albumin	67 000		4,8261		29,62		29,00	0,62		77 202	-10 202
ovalbumin	43 000		4,6335		31,56		31,15	0,41		47 196	-4 196
kimotripsz.	25 000		4,3979		33,93		34,90	-0,97		20 005	4 995
RNáz	13 700		4,1367		36,55		36,45	0,10		14 030	-330

Pak1 foszforilációs kísérleteink kiindulási alapja, Vadlamudi és mtsi. 2004-es kináz aktivitás vizsgálata



45. ábra: Vadlamudi és mtsi. *in vitro* kináz assay kísérlete (2004). A Pak1 kötötte a DLC C-terminális 20 aminosavas szakaszát (GST-DLC 70-89; C. ábra/5). A Pak1 kötötte, és foszforilálta is a DLC C-terminálisát (GST-DLC 61-89; E. ábra). A 88-89. aminosavak delécioja esetén nem történt foszforiláció (DLC 1-87; E. ábra), valamint a DLC-S88A esetében sem (F. ábra).

Egy nem konvencionális miozin könnyű lánc vizsgálata

Miozin-5a (Q9Y4I1-01, humán, MV1 N-terminálisától (1158) az MV-GTD C-terminálisáig (1742. as.))

[illegible]

DLC (NM 003746 és NM 080677, humán, teljes fehérje (1-89))

[illegible]

nNOS (NM 000620, DLC-kötő peptid) KIM01202920

Bim (AF032460, DLC-kötő peptid)

IxBα (P25963, humano, 1-100 aa.)

PKI α (P61925, humán, teljes fehérje, 1-76 as.) MTQVETTEAGDFIARDSTQRRGATINCILVERARDKKELALKLAGLDINFTKKCKEAGSRSTGQSEKQCKAARKEK

GKAP (U67988, humano, 558-795 aa.)

ATMEN (NM 015251, humano, 362-823 aa.)

Pak1 (NM 002576, humano, 204-281aa.)

BMF (AY029254, humán, teljes fehérje, 1-204 as.)